Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
Klinik A, der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. W. Schneider

UNTERSUCHUNGEN DER FOLSÄURE- UND VITAMIN B_{12}-KONZENTRATIONEN BEI PATIENTEN MIT CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ, DIALYSE-PATIENTEN, CHRONISCHEN ALKOHOLIKERN UND BEI PATIENTEN MIT HÄMATOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Willy Peters

1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544328_0010

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
Klinik A, der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. W. Schneider

UNTERSUCHUNGEN DER FOLSÄURE- UND VITAMIN B_{12}-KONZENTRATIONEN BEI PATIENTEN MIT CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ, DIALYSE-PATIENTEN, CHRONISCHEN ALKOHOLIKERN UND BEI PATIENTEN MIT HÄMATOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Willy Peters

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Reinauer

Referent
gez.: Priv.-Doz. Dr. Fischer

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Strohmeyer

INHALT

Seite

A) EINFÜHRUNG

1. Physiologisch - chemische Charakterisierung der Folsäure und klinische Symptomatik des Folsäuremangels 1

2. Physiologisch - chemische Charakterisierung des Vitamin B_{12} und klinische Symptomatik des Vitamin B_{12}-Mangels 2

3. Geschichtliche Entwicklung der Bestimmungsverfahren für Folsäure und Vitamin B_{12} 4

4. Zielsetzung 5

B) PATIENTEN

1. Tabellarische Darstellung der untersuchten Patientengruppen 6

2. Charakterisierung der einzelnen Patientengruppen durch relevante klinische Daten 6

C) METHODIK

1. Blutentnahme 13

2. Schilderung der Bestimmungsmethoden und Normbereiche der hämatologischen und nephrologischen Daten 13

3. Generelle Darstellung des Radioassay am Beispiel der Folsäurebestimmung 14

Seite

4. Bei der Folsäurebestimmung verwendete Reagenzien und Geräte sowie Diskussion dieser Materialien 15

5. Zubereitung des Hämolysates für die Folsäurebestimmung in den Erythrozyten 19

6. Arbeitsablauf der Folsäurebestimmung im Plasma und in den Erythrozyten 20

7. Bei der Vitamin B_{12}-Bestimmung verwendete Reagenzien und Geräte sowie Diskussion dieser Materialien 24

8. Arbeitsablauf der Vitamin B_{12}-Bestimmung im Plasma 26

D) ERGEBNISSE

1. Normbereiche der Vitamine und Definition des Folsäure- bzw. Vitamin B_{12}-Mangels 28

2. Ergebnisse der inter - assay Kontrollen 29

3. Sämtliche klinisch - chemischen Befunde aller Patienten und Normalpersonen 30

4. Folsäurekonzentrationen im Plasma 33

5. Vitamin B_{12}-Konzentrationen im Plasma 34

6. Folsäurekonzentrationen in den Erythrozyten 35

7. Veränderungen der Folsäurekonzentration im Plasma durch Dialyse und Substitutionspause 37

8. Veränderungen der Folsäurekonzentration in den Erythrozyten durch Dialyse und Substitutionspause 39

Seite

E) DISKUSSION

1. Patientenauswahl und Zusammenstellung der Gruppen 42
2. Bedeutung der Vitamin B_{12}-Bestimmung 42
3. Reproduzierbarkeit und Spezifität der Methoden 43
4. Normbereiche der Vitamin-Werte 44
5. Beziehung zwischen Folsäuremangel und Anämie bei den chronisch Niereninsuffizienten 46
6. Dialyse und Folsäuremangel 47
7. Folsäuresubstitution bei Dialysepatienten 48
8. Heimdialyse - Klinikdialyse 50
9. Veränderungen der Folsäurekonzentrationen während Dialyse und einer Substitutionspause 51
10. Folsäuremangel bei nichtdialysierten chronisch Niereninsuffizienten 52
11. Folsäuremangel und Anämien bei chronischen Alkoholikern 54
12. Vitamin B_{12}-Werte bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen 56
13. Folsäurekonzentrationen bei Vitamin B_{12}-Mangel 57

F) ZUSAMMENFASSUNG 59

G) LITERATURVERZEICHNIS 62

A. Einführung

Folsäure (Pteroylglutaminsäure) und Vitamin B_{12} (Cobalamin) gehören zu den wasserlöslichen Vitaminen der B-Gruppe. Beide sind für den Menschen essentielle Nahrungsfaktoren. Die Produktion durch die Kolonflora ist für den Menschen ohne Bedeutung, da diese Vitamine im Kolon nicht in ausreichendem Maße resorbiert werden.

Folsäure, die im Jejunum resorbiert wird, findet sich in pflanzlichen und tierischen Nahrungsmitteln, hauptsächlich in grünen Blättern.

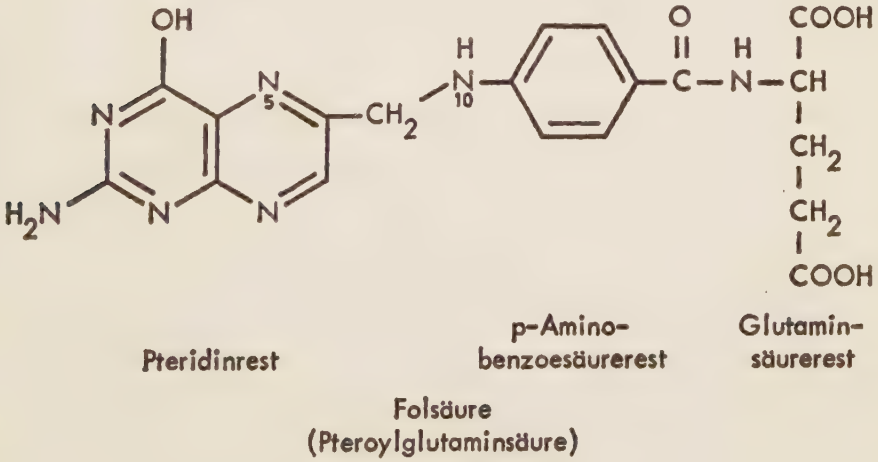

Abb. 1: Folsäuremolekül

Das Molekulargewicht beträgt für die Monoglutamatform 441, für die Heptaglutamatform 1.215.
Folsäure ist in ihrer aktiven Form, der Tetrahydrofolsäure, als Überträger und Aktivator von Ein-C-Einheiten von Bedeutung. Diese C-Derivate können während der Bindung an Position N_5 und (oder) N_{10} reversibel in alle Oxidationsstufen überführt werden. Auf diese Art ist die Folsäure unter anderem an der Biosynthese der Purine, des Thymins und der Aminosäure Methionin beteiligt, also an der DNS- und Proteinsynthese (42), (6), (46).
Ein Folsäuremangel äußert sich in einer hyperchromen, makrozytären Anämie mit Glossitis, entzündlichen Veränderungen an der Mundschleimhaut und einer Atrophie des lymphatischen Apparates (51), (52).

Vitamin B_{12}-haltig sind die Lebensmittel tierischer Herkunft. Dieses Vitamin wird an ein sialinsäurehaltiges Glykoprotein der Magenschleimhaut, den Intrinsic-Faktor, komplex gebunden und so im unteren Ileum resorbiert.
Aquocobalamin hat ein Molekulargewicht von 1.317.
Das Vitamin B_{12} wirkt unter anderem bei der Methylmalonat-Succinat Isomerisation, der Bildung des Myelins und zusammen mit der Folsäure bei der Synthese des Methionins, jener Aminosäure, die das erste Glied jeder neuen Proteinkette ist und später bei vielen Proteinen wieder abgespalten wird (6), (8), (9).

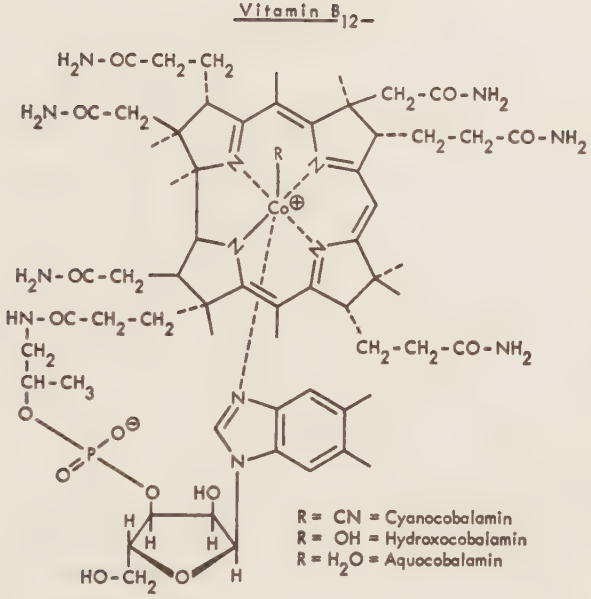

Abb. 2: Vitamin B_{12}-Molekül

Die funktionell enge Verknüpfung des Vitamin B_{12} und der Folsäure wird in der Literatur des öfteren hervorgehoben (52), (9), (51), und sie erklärt auch die weitgehend ähnlichen Krankheitssymptome beim Mangel eines der beiden Vitamine. Bei Vitamin B_{12}-Mangel treten lediglich noch neurologische Symptome hinzu. Die gemeinsamen Mangelsymptome der genannten Vitamine gründen im wesentlichen auf einen Block der DNS-Synthese, der beim Folsäuremangel direkt, beim Vitamin B_{12}-Mangel indirekt eintritt und der sich an Geweben mit hoher

Zellneubildungsrate am ehesten bemerkbar macht. Der Fetus sowie Tumoren haben einen hohen Folsäurebedarf (46).

Nachdem 1941 die Folsäure isoliert wurde (54), erprobte man verschiedene Bestimmungsmethoden, 1943/44 biologische Methoden mit Kücken, 1948/49 chromatographische und photometrische Verfahren (8), die jedoch alle nicht die erwartete diagnostische Aussagekraft lieferten. Die Ergebnisse des Formiminoglutaminsäure-Exkretionstestes (Figlu-Test) sind zwar primär bei Folsäuremangelzuständen erhöht, jedoch auch in einigen Fällen von Vitamin B_{12}-Mangel, Streiff (54), was seine differentialdiagnostische Bedeutung mindert. Die nach 1950 eingeführten mikrobiologischen Bestimmungsverfahren, in der Hauptsache das mit Lactobacillus casei, haben den Nachteil, daß sie durch Antibioticagabe beeinflußt werden und in der Durchführung sehr aufwendig sind. Nachdem V. Herbert 1961 den Folsäuremangel experimentell beim Menschen nachgewiesen hatte, setzten sich ab 1965 die Isotopenverdünnungsmethoden zur Folsäurebestimmung durch, die seitdem ständig verbessert wurden. Die Folsäurebestimmung in den Erythrozyten ist zusätzlich zur Bestimmung im Plasma wichtig, da nur sie eine Auskunft über den langfristigen Folsäurehaushalt ermöglicht (54). Die Folsäurekonzentration im Plasma kann z. B. durch eingenommene Mahlzeiten beeinflußt werden. Lasker et al. (30) wiesen 1963 als erste auf erniedrigte Folsäurekonzentrationen bei Dauerdialysepatienten hin. 1967 stellten Hampers und Mitarbeiter (16) die Dialysierbarkeit der Folsäure in vitro fest und äußerten, daß ihre Ergebnisse wahr-

scheinlich auch für in-vivo Bedingungen gelten.
Das Vitamin B_{12} wurde 1955 als Antiperniziosa-Faktor isoliert (54). Der Schilling-Test dient nur zum Nachweis von Vitamin B_{12}-Resorptionsstörungen aufgrund eines Intrinsic-Faktor Mangels. Etwa ab 1965 wurden Radioassays zur direkten Vitamin B_{12}-Bestimmung entwickelt.

Diese Arbeit versucht in der Hauptsache folgende Fragen zu beantworten:

a) Ist der Radioassay eine praktikable Methode zur Bestimmung der Folsäure bzw. des Vitamin B_{12}?
b) Wie verhalten sich die Folsäurekonzentrationen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention?
c) Wie verhalten sich die Folsäurekonzentrationen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz?
d) Welchen Einfluß hat die Hämodialyse auf die Folsäurekonzentrationen und ergeben sich Unterschiede zwischen den Heimdialysepatienten und den in der Klinik dialysierten?
e) Wie verhalten sich die Folsäurespiegel bei Patienten mit chronischem Alkoholismus, bei solchen mit Vitamin B_{12}-Mangelzuständen und bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen?
f) Entstehen bei den Patienten der untersuchten Gruppen megaloblastäre Anämien aufgrund eines Folsäuremangels?
g) Welche Bedeutung hat die Vitamin B_{12}-Bestimmung bei verschiedenen Patientengruppen?

B. Patienten

Die Folsäure- und Vitamin B_{12}-Konzentrationen wurden bei verschiedenen Patientengruppen untersucht (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1:

I: Normalgruppe

II: Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

a) Patienten im Stadium der kompensierten Retention

b) Patienten der Heimdialyse

c) Patienten der Klinikdialyse

d) Patienten der Klinikdialyse mit Folsäuresubstitution

III: Patienten mit chronischem Alkoholabusus

IV: Patienten mit myeloproliferativen Syndromen

V: Patienten mit Vitamin B_{12}-Mangelerscheinungen

Die Gruppe I bestand aus 20 Personen - 14 Männer und 6 Frauen-, die sich aus Studenten und Klinikpersonal zusammensetzten. Diese Personen fühlten sich alle subjektiv gesund und hatten nach eigener Aussage keine besonderen, für diese Studie erwähnenswerten Ernährungsgewohnheiten. Es befand sich in dieser Gruppe kein Alkoholiker. Niemand hatte die untersuchten Vitamine in medikamentöser Form zu sich genommen. Das Alter der Personen betrug 23 - 45 Jahre, im Durchschnitt 29 Jahre.

Die chronischen Niereninsuffizienten (Gruppe II) wurden in vier Gruppen unterteilt:

Die Gruppe II a bestand aus 31 Patienten - 16 Männer und 15 Frauen - mit der Diagnose chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention. Das Vitamin B_{12} konnte nur bei 29 Patienten dieser Gruppe gemessen werden. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 47 Jahre, bei einem Rang von 22 - 72 Jahren. Die chronische Niereninsuffizienz bestand bei diesen Patienten 3 bis 132 Monate, im Durchschnitt 41 Monate. Die Nachforschung nach der Dauer der Niereninsuffizienz gestaltete sich schwierig und war in einigen Fällen nicht möglich, wie es bei chronischen Krankheiten allgemein schwierig ist, einen Zeitpunkt des Beginns zu bestimmen. Es wird daher in der Regel willkürlich der Zeitpunkt der ersten Erhebung pathologischer Nierenwerte in dieser Klinik als Beginn der Krankheit angenommen. Der chronische Verlauf des Leidens wurde durch Ausschluß eines akuten Nierenversagens diagnostiziert. Keiner dieser Patienten ist je dialysiert worden oder hat in den Monaten vor der Blutentnahme zur Vitaminbestimmung eine Bluttransfusion erhalten. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, daß von diesen Patienten niemand mehrere Monate vor der Untersuchung Folsäure oder Vitamin B_{12} in medikamentöser Form zu sich genommen hat. Den Patienten wurde in der Klinik keine besondere Diät empfohlen, allenfalls eine leichte Eiweißrestriktion (40 - 60 g/d). Alle Patienten dieser Gruppe hatten Creatinin-Werte größer als 1,3 mg % und Harnstoff-N-

Werte über 18 mg %. Patienten mit Creatinin-Werten im Serum zwischen 1,3 und 3,0 mg % wurden jedoch nur berücksichtigt, wenn die Werte der endogenen Creatinin-Clearance niedriger lagen als 50 ml/min, umgerechnet auf 1,73 m^2 Körperoberfläche. Lediglich bei einer Patientin, F. St., betrug die Creatinin-Clearance 58 ml/min.

Die Gruppe II b bestand aus 14 Patienten - 9 Männer und 5 Frauen - die regelmäßig im Heimverfahren dialysiert wurden. Vitamin B_{12}-Werte konnten nur von 5 dieser Patienten erhoben werden. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 32 Jahre bei einem Rang von 13 - 50 Jahren. Die erste Dialyse lag bei ihnen 5 bis 38 Monate zurück, im Durchschnitt 18 Monate. Die erste Heimdialyse lag 4 - 15 Monate zurück, bei einem Durchschnitt von 12 Monaten. Die letzte Dialyse vor der Blutentnahme war jeweils 2 bis 3 Tage vorher. Das Blut wurde beim Anschluß des Patienten an das Dialysegerät entnommen. Die Dauer der Dialyse betrug 2 bis 3 mal wöchentlich 6 bis 8 Stunden. Es wurden Plattendialysatoren des Typs Gambro optima und bei 2 Patienten Kapillarnieren des Modells 201 - 300 verwandt. Keiner der Patienten hat einige Monate vor der Blutentnahme Vitamine in medikamentöser Form oder Bluttransfusionen erhalten. Die Patienten wurden angehalten, eine normale, oder besser eine besonders eiweißreiche Kost zu sich zu nehmen, d. h. 70 g/d Eiweiß oder mehr.

Als Gruppe II c wurden 11 Patienten untersucht, die regelmäßig in der Klinik dialysiert worden sind. Es handelt sich um 6 Männer und 5 Frauen. Bei einem Patienten konnte aus organisatorischen Gründen kein Vitamin B_{12}-Wert erhoben werden. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 44 Jahre bei einem Rang von 22 - 63 Jahren. Die erste Dialyse lag bei den Patienten ein bis 16 Monate zurück, im Durchschnitt vier Monate. Das Blut für die Bestimmungen wurde bei Anschluß der Patienten an das Dialysegerät entnommen. Die letzte Dialyse lag jeweils 2 - 3 Tage zurück. Bei zwei Patienten wurden die Folsäure-Konzentrationen zusätzlich direkt nach der Dialyse gemessen, und 14 Tage später wieder vor der Dialyse. Bei weiteren 2 Patienten dieser Gruppe wurden die Folsäure-Konzentrationen vor der Dialyse, nach der Dialyse und 4 Wochen später vor einer Dialyse gemessen. Die Dialysezeit betrug 2 - 3 mal 6 bis 8 Stunden in der Woche. Es gelangten Plattendialysatoren der Typen Gambro optima und Gambro major, sowie Spulendialysatoren der Typen Fresenius EX 25 und EX 29 zur Anwendung. Keiner dieser Patienten hat einige Monate vor der Blutentnahme Folsäure- oder Vitamin B_{12}-haltige Medikamente erhalten. Die letzte Bluttransfusion lag immer 3 Monate vor der Blutentnahme. Die Ernährung dieser Patienten entspricht der Kost der Heimdialysepatienten (Gruppe II b).

Die Gruppe II d bestand aus 11 Patienten der Klinikdialyse - 7 Männer und 4 Frauen -, die jedoch regelmäßig

4 mg Folsäure pro Tag in medikamentöser Form erhielten. Das Alter dieser Patienten betrug 35 bis 59 Jahre bei einem Durchschnitt von 46 Jahren. Bluttransfusionen hatten bei diesen Patienten wie in allen anderen Gruppen einige Monate vor der Blutentnahme nicht stattgefunden. Die Dialysebehandlung begann im Durchschnitt vor 36 Monaten, im einzelnen vor 1 bis 98 Monaten. Der Blutentnahmemodus entsprach dem der übrigen Dialysepatienten. Es wurden die gleichen Dialysegeräte wie bei der Gruppe II c verwandt. Die Folsäurekonzentrationen wurden jeweils vor und direkt nach der Dialyse gemessen, bei 3 Patienten zusätzlich nach 14-tägiger medikamentöser Folsäurekarenz vor der Dialyse, sowie bei 6 Patienten zusätzlich nach 4-wöchiger medikamentöser Folsäurekarenz vor der Dialyse. 2 Patienten dieser Gruppe wechselten nach der ersten Blutentnahme die Klinik, so daß sie für die weiteren Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung standen.

Die Gruppe III bestand aus 8 Patienten mit chronischem Alkoholabusus. Es handelte sich um 4 Frauen und 4 Männer mit einem Durchschnittsalter von 41 Jahren bei einem Rang von 35 bis 51 Jahren. Bei einem Patienten konnte aus organisatorischen Gründen kein Vitamin B_{12}-Wert erhoben werden. Keiner der Patienten erhielt Folsäure oder Vitamin B_{12} in medikamentöser Form, Bluttransfusionen hatten lediglich bei einem Patienten, W. Ha., 2 Tage vor der Bestimmung stattgefunden. Bei allen Patienten konnten

andere Ursachen, die zu einer Störung des Folsäure- oder Vitamin B_{12}-Haushaltes führen, ausgeschlossen werden.

Schließlich wurden die Folsäure- und Vitamin B_{12}-Konzentrationen bei 6 Patientinnen gemessen, die an myeloproliferativen Syndromen erkrankt waren (Gruppe IV). Die speziellen Diagnosen lauteten Blastenkrise nach vorangegangener Polyzythämia vera, Ostemyelosklerose, Polyzythämia vera und in 3 Fällen chronisch myeloische Leukämie. Das Alter der Patientinnen betrug im Durchschnitt 59 Jahre und rangierte von 22 bis 80 Jahren. Keine der Patientinnen hatte einige Monate vor der Bestimmung die untersuchten Vitamine in medikamentöser Form zu sich genommen, noch hatten Bluttransfusionen bei diesen Patientinnen stattgefunden. Die Patientinnen mit chronisch myeloischer Leukämie befanden sich zur Zeit der Blutentnahme unter zytostatischer Therapie mit Myleran. Keine der 6 Patientinnen hat je Folsäureantagonisten erhalten. An zusätzlichen Krankheiten, die den Folsäure- und Vitamin B_{12}-Haushalt beeinflussen, ist bei einer Patientin, F. St., eine chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention zu erwähnen. Diese Frau ist in Gruppe II a ebenfalls aufgeführt.

Um die Vitamin B_{12}-Messung auch bei erniedrigten Konzentrationen dieses Vitamins zu testen, und das Verhalten der Folsäurekonzentrationen bei diesen niedrigen Vitamin B_{12}-Werten zu sehen, wurden die Vitamine bei 3

Patienten mit makrozytären, hyperchromen Blutbildveränderungen untersucht (Gruppe V). Es handelte sich um Patienten von 79, 86 und 60 Jahren, zwei Frauen und einen Mann. Kein Patient erhielt die untersuchten Vitamine mehrere Monate vor der Untersuchung in medikamentöser Form. Ein Patient erhielt 3 Tage vor der Untersuchung 800 ml Erythrozytenkonzentrat.

C. Methodik

Falls das Blut nicht zu bestimmten Zeitpunkten entnommen wurde, wie bei den Dialysepatienten erwähnt, fand die Blutentnahme vormittags bei nüchternen Patienten statt. 12 ml venöses Blut wurden in zwei EDTA-Röhrchen gegeben. Eines der Röhrchen wurde für die Bestimmung der Folsäure und des Vitamin B_{12} sofort weiterverarbeitet, das andere diente zur Erhebung der Werte des kleinen Blutbildes. Hierzu wurde ein Autoanalyzer, Coulter Counter Modell S, benutzt. Es ergeben sich mit dieser Methode folgende Normbereiche:

Erythrozyten	m. 4,6 - 6,2 x 10^6	w. 4,2 - 5,4 x 10^6
Hämoglobin	m. 14 - 18 g %	w. 12 - 16 g %
Hämatokrit	m. 42 - 52 %	w. 37 - 47 %
MCV	m. 80 - 94 μ^3	w. 80 - 98 μ^3
Hb_E	m. 27 - 31 pg	w. 27 - 31 pg

Das Serumcreatinin wurde im nephrologischen Labor der Klinik nach der Jaffé-Reaktion, Verfahren mit Enteiweißung, bestimmt. Normbereich: 0,6 - 1,3 mg/100 ml Serum. Der Harnstoff-N im Serum wurde durch enzymatische Hydroloyse mit Urease und anschließender Berthelot-Reaktion bestimmt. Der Normbereich beträgt 9-18 mg/100 ml Serum, bei einer Proteinzufuhr von 1 g/kg Körpergewicht und Tag. Für die Bestimmung der endogenen Creatinin-Clearance wurde eine ge-

nau definierte Harnsammelperiode gewählt. Das Creatinin in Urin und Serum wurde nach der Reaktion nach Jaffé bestimmt. Der Normbereich beträgt mehr als 95 ml/min., umgerechnet auf 1,73 m^2 Körperoberfläche.

Die Folsäure im Plasma und in den Erythrozyten wurde mit dem „Folate Radioassay Kit ^{125}J" der Firma Becton, Dickinson und Co. (2) bestimmt. Es handelt sich um einen Radioassay mit kompetitiver Proteinbindung nach vorheriger Hitze-Denaturierung des endogenen Proteins. Diese Methode eignet sich besonders für die Bestimmung von chemisch bekannten Molekülen, die in sehr geringen Mengen - bei der Folsäure in ng/ml, beim Vitamin B_{12} in pg/ml - in Körperflüssigkeiten vorkommen; siehe Abbildung 3.

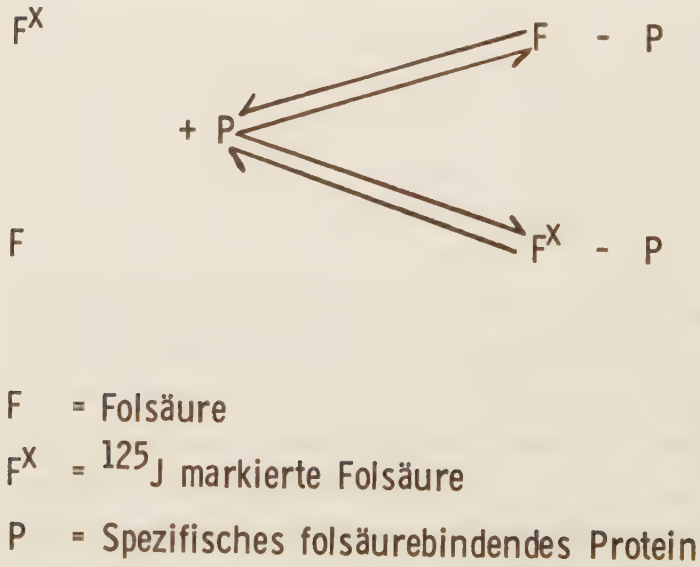

Abb. 3: Schematische Darstellung des Radioassay

Gibt man also eine unbekannte Menge Folsäure mit einer bekannten Menge radioaktiv markierter Folsäure und einer bekannten Menge spezifischen folsäurebindenden Proteins in ein Reagenzglas und inkubiert es 30 Minuten bei Zimmertemperatur, so befindet sich in dem Reagenzglas freie Folsäure, freie markierte Folsäure, an das Protein gebundene Folsäure und an das Protein gebundene markierte Folsäure. Mit einem Adsorbens, das so präpariert ist, daß es nur Moleküle bis zu einem bestimmten Molekulargewicht adsorbiert, kann man jetzt die freie von der an Protein gebundenen Folsäure trennen. Im Überstand, in dem sich die an Protein gebundene markierte sowie nicht markierte Folsäure befindet, wird mit Hilfe eines Gamma-Counters die Gammastrahlenaktivität gemessen. Sie ist um so größer, d. h. es befindet sich um so mehr markierte Folsäure am Protein, je weniger nicht markierte Folsäure man dem Reagenzglas zugegeben hat. Die genaue Folsäurekonzentration erhält man, indem die unbekannte Menge Folsäure mit einer in der gleichen Weise gemessenen bekannten Menge verglichen wird, also durch Erstellen einer Standardkurve.

Von mehreren Autoren, Dunn und Foster (10), Waxman und Schreiber (57), Rothenberg et al. (49), Kubasik et al. (27), Heilmann et al. (17) wird einhellig, wie auch in diesem Assay (2) das Beta-Laktoglobulin der Kuhmilch als spezifisches folsäurebindendes Protein benutzt, nachdem Herbert (22) und Waxman et al. (56) zunächst pulverisierte Kuhmilch eingesetzt hatten. Der hier verwendete Assay ge-

braucht Pteroylglutaminsäure (PGS) als markierte Folsäure und auch als Standard. Die hauptsächliche Form der endogenen Folsäure, sowohl der gespeicherten als auch der zirkulierenden, ist dagegen N_5-Methyltetrahydrofolsäure (N_5-Methyl-THFS). Wie Herbert (22), Waxman et al. (56) und (2) angeben, ist diese endogene Folsäure in gereinigter und gelöster Form auch in Anwesenheit von Reduktionsmitteln sehr unstabil, so daß in den vergangenen Jahren verschiedene Autoren nach Wegen suchten, die N_5-Methyl-THFS durch PGS zu ersetzen. Waxman und Schreiber (57), Waxman et al. (56), Mortensen (39) und Mitchell et al. (38) haben die Affinität der beiden Folsäuremoleküle zum bindenden Protein miteinander verglichen und festgestellt, daß es hierbei Unterschiede gibt. Rothenberg und Da Costa (49) weisen darauf hin, daß die unterschiedliche Affinität von PGS und N_5-Methyl-THFS zum Beta-Laktoglobulin nicht mit der Zahl der Glutamatmoleküle zusammenhängt, sondern mit dem Oxidationszustand des Pteridinringes und dem C-Derivat in Position N_5. Mortensen (39) sowie Givas und Gutcho (14) erkannten, daß bei pH 9,3 die Affinität von PGS und N_5-Methyl-THFS zum Bindeprotein identisch ist. Aus diesem Grunde wurde in dieser Studie ein Lysin-Gelatin-Puffer mit dem pH-Wert 9,3 (2) benutzt, so daß mit der besser haltbaren PGS gearbeitet werden konnte.

Dieses Folsäuremolekül war mit dem Isotop ^{125}J markiert. ^{3}H eignet sich ebenfalls zur Markierung der Folsäure,

Mortensen (39), Waxman und Schreiber (57), Herbert (22). Kubasik et al. (27) haben 6 handelsübliche Folsäure-„Kits", 3 ^{125}J und 3 Tritium markierte, miteinander verglichen. Sie stellten fest, daß die Ergebnisse erheblich variierten, wobei die ^{125}J markierten Assays deutlich niedrigere Folsäurewerte lieferten. Die Autoren begründen diese Tatsache allerdings nicht ausschließlich mit der unterschiedlichen Markierung, da stets mehrere Faktoren der vergleichenden Untersuchung verändert wurden. Heilmann et al. benutzten in einer ersten Untersuchung (17) ^{3}H als Marker und konnten bei Normalpersonen durchschnittlich 6,8 ng/ml Folsäure bestimmen. In einer folgenden Studie (19) verwandten sie ^{125}J als Marker und maßen bei Normalpersonen im Mittel 7,05 ng/ml. Die in dieser Arbeit verwendete ^{125}J-PGS bietet mehrere technische Vorteile. Zum einen sind die Gamma-Strahlen mit geringerem Aufwand an Kosten und Zeit zu messen als die Beta-Strahlen des Tritium, Kubasik et al. (27), Becker et al. (1), zum anderen ist ein eventueller Kontaminationsschaden bei ^{125}J mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen wesentlich geringer als bei ^{3}H mit einer Halbwertszeit von 12 Jahren (1).

Zur Aktivitätsmessung diente der Bohrlochzähler der Firma Frieseke und Höpfner GmbH, Erlangen, mit der Einstellung 35 KeV für Gamma-Energie, bei einer Verstärkung von „grob" 40 fach und „fein" 6,40. Der Diskriminator war auf eine untere Schwelle von 0,80 und eine obere Schwelle von 1,60 eingestellt.

Laut Dunn und Foster (10), Waxman und Schreiber (57), Eichner et al. (11) und Waxman (58) enthält Blut spezifische folsäurebindende Proteine. Damit diese die Methode der kompetitiven Proteinbindung nicht stören, gehört zu dem hier benutzten Assay eine Hitzedenaturierung der Proteine bei pH 9,3. Dunn und Foster geben an, daß sie die Hitzedenaturierung bei alkalischem pH ohne Zugabe von Askorbinsäure durchführen. Auf diese Weise verlieren die Proteine ihre Bindungsfähigkeit, das Folsäuremolekül dagegen wird nicht verändert. Eichner et al. (11) erwähnen, daß die ungesättigten folsäurebindenden Proteine, wie sie bei Urämikern in erhöhter Konzentration gefunden werden, zu falsch niedrigen Folsäurewerten im Serum führen können. Dieser Fehler entfällt bei einer Hitzedenaturierung in alkalischem Milieu.

Die Stabilität der Folsäure bei Erhitzung und während der Lagerung vor der Untersuchung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. In der Literatur existieren über die Stabilität der Folsäure bei Lagerung noch gegensätzliche Ansichten (10). Daß sie vor Licht geschützt werden muß, wird in vielen Studien erwähnt (2).

Als Adsorbens diente mit Dextran ummantelte „Carbo medicinalis" (2). Die so präparierte Kohle adsorbiert bei + 4°C die markierten und nicht markierten Folsäuremoleküle, die

an Protein gebundene Folsäure bleibt dagegen im Überstand. Die verwendete Menge an Kohle und die Inkubationszeit zur Adsorption der Folsäure wurden genau konstant gehalten. Nach Mortensen (39) sind diese beiden Faktoren zum Erhalt reproduzierbarer Ergebnisse nicht so entscheidend, wenn die Kohle mit Gelatin anstatt mit Dextran präpariert ist.

Nachdem das venöse Blut in ein EDTA-Röhrchen gegeben und 10 Minuten gut durchmischt wurde, erfolgte zunächst die Zubereitung des Hämolysates für die Folsäurebestimmung in den Erythrozyten. 2 ml 0,2 %-ige Askorbinsäurelösung und 100 µl gutdurchmischtes Blut wurden in ein Reagenzglas gegeben, so daß eine Verdünnung 1:21 resultierte. Dieses Hämolysat wurde bei Raumtemperatur 90 Minuten unter Lichtabschluß inkubiert und anschließend bei - 20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Folsäure liegt in den Erythrozyten als Polyglutamat vor, wogegen im Plasma das Monoglutamat der N_5-Methyl-THFS vorherrscht, wie Rosenberg (47) und Das und Herbert (9) schreiben. Die endogene Gamma-Glutamyl-Peptidase hydrolisiert während der Inkubation die Polyglutamate der Erythrozyten. Dies ist wichtig für eine identische Reaktivität gegenüber dem folsäurebindenden Protein (2), (9). Rothenberg und Da Costa (49) schließen sich dieser Meinung nicht an. Sie halten nicht die Zahl der Glutamatmoleküle, sondern den Oxidationszustand des Pteridinringes und das C-Derivat in Position N_5 für bedeutungsvoll bezüglich der Reaktivität gegenüber dem Beta-Laktoglobulin.

Das restliche Vollblut wurde 10 Minuten mit 2.500 Umdrehungen/min zentrifugiert und das Plasma in saubere Röhrchen pipettiert, um es ebenfalls bei -20°C zu lagern. Durchschnittlich vergingen 14 Tage bis zur Weiterverarbeitung der Proben. Keine Probe wurde wiederholt tiefgefroren, und es wurde während des Assay sehr darauf geachtet, daß alle Materialien, die Folsäure enthalten, vor Licht geschützt waren. Während der Inkubationszeiten waren die Reagenzgläser mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Röhrchen	Puffer µl	Standard µl	Patientenprobe µl		^{125}J-Folsäure µl	Bindeprotein µl		Carbo medicinalis dextranummantelt ml		
1, 2	1400	-	-	-	100	-	Inkubation	-	-	-
3, 4	1000	-	-	Inkubation	100	-		0,4	Inkubation	Zentrifugation
5, 6	900	-	-	der Röhr-	100	100	aller Röhr-	0,4		der Röhrchen
7, 8	900	50 A	-	chen bei	100	100	chen bei	0,4	der Röhr-	
9, 10	900	50 B	-	100 Grad C	100	100	Raumtem-	0,4	chen bei	bei + 4 Grad C
11, 12	900	50 C	-	für 15 Mi-	100	100	peratur	0,4	Raumtem-	und 3000 Upm
13, 14	900	50 D	-	nuten. An-	100	100		0,4	peratur	
15, 16	900	50 E	-	schließend	100	100	für 30	0,4	für 5	für 15
Patienten- probe	900	-	50	Abkühlung auf 20-25 Grad C	100	100	Minuten	0,4	Minuten	Minuten

Abb. 4: Arbeitsablauf der Folsäurebestimmung

Mit dem Einfüllen des Puffers von pH 9,3 in saubere Reagenzgläser begann der Assay, der etwa 5 Stunden in Anspruch nimmt (siehe Abbildung 4). Darauf folgend wurden der Standard und die aufgetauten Patientenproben pipettiert. Nur 50 ul sind von jeder Probe erforderlich.

Der nächste Schritt bestand in der Denaturierung der endogenen Proteine. Zu diesem Zweck wurden die Röhrchen mit Plastikkappen abgedeckt und für 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad gegeben, um anschließend sofort auf 20 - 25°C gekühlt zu werden. Zunächst wurde nun die radioaktive PGS, dann das Beta-Laktoglobulin zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Bindungsvorgang durch Zugabe der auf + 4°C gekühlten Kohle beendet. Zur Adsorption wurden die Röhrchen nochmals 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, worauf die Trennung der freien von der gebundenen Folsäure durch Zentrifugation bei 3.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten bei + 4°C erfolgte. Nach jeder Reagenzienzugabe wurden die Röhrchen leicht geschüttelt, nach Zugabe der Kohle intensiv gerührt. Der Überstand der zentrifugierten Reagenzgläser wurde nun in saubere Röhrchen dekantiert. Hierauf folgte für 2 Minuten die Messung der Radioaktivität im Bohrlochzähler.

Die resultierenden Zählraten wurden um den Leerwert korrigiert. Die „Trace Binding" (Bo), also der Grad der Bindung der ^{125}J-PGS an das spezifische Bindeprotein, wurde durch Division der Zählrate aus den Röhrchen, die

weder Standardfolsäure noch endogene Folsäure enthielten, durch die totale Zählrate des Assays errechnet (siehe Abbildung 5). In Prozent ausgedrückt liegt dieser Wert bei fast allen 23 Untersuchungen zwischen 40 % und 60 %. Nur ein Assay zeigte eine Bo von etwas weniger als 40 %. Durch Division der korrigierten Zählrate jedes Röhrchens, durch die korrigierte Zählrate der Röhrchen, die weder Standardfolsäure noch endogene Folsäure enthielten, resultierte der Prozentanteil jedes Röhrchens an der „Trace Binding" (% der Bo).

$$\text{Leerwert} = \frac{\text{Zählrate des Röhrchens 3} + \text{Zählrate des Röhrchens 4}}{2}$$

$$\text{Bo} = \text{"Trace Binding"} = \frac{\text{durchschnittliche, korrigierte Zählraten der Röhrchen 5 + 6}}{\text{durchschnittliche, korrigierte Zählraten der Röhrchen 1 + 2}} \times 100$$

$$\text{\% der "Trace Binding"} = \frac{\text{korrigierte Zählrate des Röhrchens 7}}{\text{durchschnittliche, korrigierte Zählraten der Röhrchen 5 + 6}} \times 100$$

Beispiel für Röhrchen 7

Abb. 5: Formeln zur Berechnung der Folsäurekonzentration

Folgende Standardfolsäure-Konzentrationen wurden in jeder Untersuchung berücksichtigt: 1,5; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0 ng/ml.

Durch Auftragen der Prozent der Trace Binding gegen die Standard-Folsäure-Konzentrationen auf doppelt logarithmisches Papier erhielt man eine Gerade, die ein genaues Ablesen der Konzentrationen in den Patientenproben erlaubte (siehe Abbildung 6).

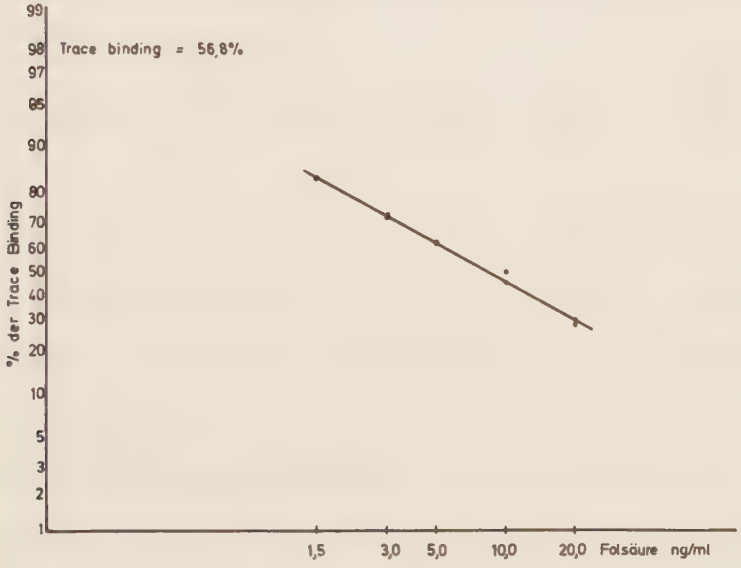

Abb. 6: Ermittlung der Folsäurekonzentration

Alle Proben- und Standardröhrchen wurden doppelt geführt, so daß der Mittelwert je zweier Werte die Folsäure-Konzentration des Patienten im Plasma ergab. Um die Konzentration an Folsäure pro ml Erythrozyten zu berechnen, wurde das Ergebnis der Folsäurekonzentration des Hämolysates mit dem Verdünnungsfaktor 21 (siehe Seite 19) multipliziert und durch

den Hämatokrit als Quotienten dividiert. Der erhaltene Wert wurde bei nicht zu hohen Folsäurewerten im Plasma nicht um diesen Plasmawert korrigiert, da die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten um etwa einen Faktor 50 höher ist als im Plasma und der sich ergebende Fehler bedeutungslos ist. Diese Meinung wird auch von einigen Autoren (39), (2) vertreten. Es wurde stets eine Kontrollprobe aus einem klinikeigenen Plasmapool mituntersucht und bei 9 Untersuchungen zusätzlich ein Kontrollserum der Firma Byk-Mallinkrodt.

Das Vitamin B_{12} im Plasma wurde mit dem „Vitamin B_{12} Radioassay Kit ^{57}Co" der Firma Becton, Dickinson und Co. (3) bestimmt. Es handelt sich wie bei der Folsäurebestimmung um einen Radioassay mit kompetitiver Proteinbindung nach vorangegangener Hitzedenaturierung der endogenen Proteine. Die Bestimmung läuft nach den selben schematischen Prinzipien ab, wie die Messung der Folsäurekonzentration. Dieser Assay verwendet wie auch die Autoren Herbert (22), Pierce und Hillmann (42), Gilbert et al. (13) und Neumann (40) Intrinsic Faktor als Bindeprotein für das endogene und das radioaktiv markierte Vitamin B_{12}. Als Standard dient synthetisches Vitamin B_{12}. Das ^{57}Co Isotop eignet sich für die radioaktive Markierung besonders, da das Vitamin B_{12}-Molekül ein Co-Atom als Zentralatom besitzt. Es ist ein reiner Gamma-Strahler mit einer Halbwertszeit von 270 Tagen; Becker et al. (1). Zur Aktivitätsmessung diente der selbe Bohrlochzähler wie bei der Folsäurebestimmung mit der Einstellung 120 KeV für

Gamma-Energie bei einer Verstärkung von „grob" 40-fach und „fein" 2,0. Der Diskriminator war auf eine obere Schwelle von 1,60 und eine untere von 0,80 eingestellt.
Laut Liu und Sullivan (38) existieren im Blut mehrere Cobalaminanaloge, hauptsächlich Methylcobalamin. Dieses wird bei Lichtexposition zum wenig stabilen Hydroxycobalamin umgewandelt. Da Cyanocobalamin die lichtstabilste Form ist und eine unterschiedliche Reaktivität der verschiedenen Analoge bei der Bestimmung nicht ausgeschlossen werden kann, wurden in jedes Reagenzglas 50 µl einer KCN-Lösung von 100 µg/ml gegeben. Dadurch liegt das gesamte Vitamin B_{12} als Cyanocobalamin vor und die Zuverlässigkeit des Assay wird hierdurch erhöht (38). Die Röhrchen für die Standardkurve erhielten je 200 µl 7 %-iges Human-Serumalbumin, damit vor der Denaturierung die Proteinkonzentration der Patientenproben und der Standardröhrchen gleich war. Da die Denaturierung der endogenen cobalaminbindenden Proteine im sauren Milieu vollständig abläuft (3), wurden vor dem Erhitzungsschritt 200 µl 0,25 N-HCL in jedes Röhrchen pipettiert. Das Cyanocobalamin ist hitzestabil. Als Adsorbens diente mit Hämoglobin ummantelte „Carbo medicinalis". Sie adsorbiert nur die ungebundenen markierten und nichtmarkierten Moleküle des Cyanocobalamin. Die Quantität der zugegebenen Kohle und die Zeit der Adsorption wurden konstant gehalten.

Das venöse Blut für die Vitamin B_{12}-Bestimmung wurde vormittags bei nüchternen Patienten entnommen und in EDTA-Röhrchen gefüllt. Das Plasma wurde abzentrifugiert und dann bei -20°C gelagert, um nach durchschnittlich 14 Tagen weiterverarbeitet zu werden. Das Plasma sowie auch das mit ^{57}Co markierte Cobalamin wurden möglichst wenig dem Licht exponiert. Keine Patientenprobe wurde wiederholt tiefgefroren. Zunächst wurde physiologische NaCl-Lösung in saubere Reagenzgläser gegeben, dann das Standard-Vitamin in die entsprechenden Röhrchen pipettiert und die KCN-Lösung sowie das Humanserumalbumin eingefüllt. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe der Patientenprobe, wovon jeweils 200 ul erforderlich waren. Mit 0,25 N HCl wurde ein saures Milieu für die darauf folgende 15 Minuten dauernde Inkubation im 100°C heißen Wasserbad geschaffen. Hiernach wurden die Röhrchen auf Raumtemperatur abgekühlt und das markierte Vitamin B_{12} sowie der Intrinsic Faktor pipettiert. Jetzt erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur, um dann den Bindungsschritt durch Zugabe der auf + 4°C vorgekühlten Kohle zu stoppen. Damit die Adsorption vollständig ablief, erfolgte an dieser Stelle wieder eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Röhrchen 20 Minuten lang mit 3.000 Umdrehungen pro Minute bei + 4°C zentrifugiert. Den Überstand dekantierte man in saubere Reagenzgläser, um dann für zwei Minuten im Bohrlochzähler die Aktivität der Gamma-

Strahlen zu messen. Die folgende Berechnung der Werte entspricht dem Vorgehen bei der Folsäurebestimmung im Plasma (siehe Abbildung 7).

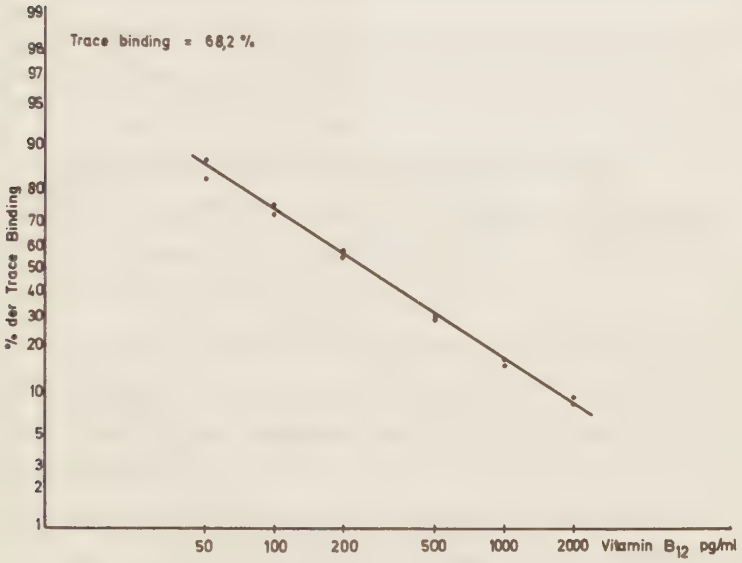

Abb. 7: Ermittlung der Vitamin B_{12}-Konzentration

Die „Trace Binding" (Bo) liegt bei allen Untersuchungen zwischen 60 % und 76 %. Die Standardkonzentrationen betrugen 50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000 pg/ml. Alle Untersuchungen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt und der Mittelwert als Ergebnis notiert. Es wurde stets eine Kontrollprobe aus einem klinikeigenen Plasmapool mitgeführt.

D. Ergebnisse

Zur Berechnung der Normbereiche für die drei untersuchten Vitaminkonzentrationen wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung der 20 Normalpersonen herangezogen und daraus der $\bar{X} \pm 2\ S$ Bereich ermittelt, der 95,5 % aller Gesunden umfaßt. So ergibt sich für das Vitamin B_{12} ein Normbereich von 250 - 1.250 pg/ml. Werte außerhalb dieser Grenzen werden als pathologisch angesehen. Für die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten reicht der Normbereich von 175 - 750 ng/ml, für die Folsäurekonzentration im Plasma beträgt er 3,2 - 13,5 ng/ml. Als intermediärer Bereich mit fraglich pathologischer Bedeutung sind Folsäurewerte im Plasma von 3,2 - 5,0 ng/ml gekennzeichnet worden. Folsäurekonzentrationen im Plasma unter 5,0 ng/ml stellen bei normalem Folsäuregehalt in den Erythrozyten einen latenten Folsäuremangel dar. Von einem manifesten Folsäuremangel kann man nur dann reden, wenn sowohl die Folsäurekonzentration im Plasma als auch in den Erythrozyten unter der unteren Normgrenze liegen. Solche Patienten zeigen in der Regel hämatologische Symptome, wogegen Patienten mit latentem Folsäuremangel selten hämatologische Zeichen eines Folsäuremangels erkennen lassen.

Die normalen und pathologischen Werte aller drei Vitamin-Bestimmungen zeigten nach Eintragung in ein Wahrscheinlich-

keitsnetz weder eine normale Verteilung noch waren sie logarithmisch normal verteilt. Deshalb wurde für die Berechnung der Signifikanzen der Rangsummentest nach Wilcoxon herangezogen. Für die Berechnung der Korrelation wurde der Spearmansche Korrelationskoeffizient „R" benutzt.
Folgende Werte ergaben sich bei den inter-assay Kontrollen:
Die Standardabweichung für die Folsäurekonzentration im klinikeigenen Plasmapool betrug 0,94 bei 23 Untersuchungen und einem Mittelwert von 6,9 ng/ml. 13,6 % war der errechnete Variationskoeffizient.
Für das im Handel erhältliche Kontrollserum konnte bei 9 Untersuchungen und einem Durchschnitt von 10,1 ng/ml eine Standardabweichung von 1,02 sowie ein Variationskoeffizient von 10,1 % berechnet werden.
Bezüglich der Vitamin B_{12}-Konzentration wurde aus dem klinikeigenen Plasmapool in 12 Untersuchungen ein Durchschnittswert von 523 pg/ml bestimmt bei einer Standardabweichung von 76,5 und einem Variationskoeffizienten von 14,6 %.

Die Normalpersonen (Gruppe I) zeigen wie erwartet bezüglich des kleinen Blutbildes und bei den Vitamin-Konzentrationen normale Werte (siehe Tabelle 2; Abbildungen 8, 9, 10). Die Hämoglobin-Konzentration beträgt bei den männlichen Probanden 15,7 g %, bei den Frauen 13,7 g %. Der Hämatokrit beläuft sich auf 44,3 % bei den Männern, sowie auf 39,6 % bei den

weiblichen Probanden. Die MCV-Bestimmung ergibt für die gesamte Gruppe im Durchschnitt 86,5 μ^3, die Errechnung des Hb_E 30,3 pg. Die Folsäure-Konzentration im Plasma beträgt im Mittel 8,3 ng/ml bei einer Standardabweichung von $\pm$ 2,57 ng/ml. Der empirische Median ist 8,3 ng/ml. In den Erythrozyten beträgt der Folsäuregehalt 459 $\pm$ 143 ng/ml. Die Messung der Vitamin B_{12}-Konzentration im Plasma ergab 765 $\pm$ 250 pg/ml.

Gruppe		I Normal-personen	IIa kompensierte Retention	IIb Heim-dialyse	IIc Klinik-dialyse	IId Klinikdialyse mit Folsäure-substitution	III Chron. Alkoho-liker	IV Myelopro-liferative Syndrome	V Vit. B_{12} Mangel
Hb	♂	15,7	9,4	9,0	7,9	7,8	10,7	-	10,2
g %	♀	13,7	10,4	8,0	7,6	7,1	13,3	10,7	10,3
Hämato-	♂	44,3	28,3	28,2	24,8	24,0	32,3	-	32,0
krit %	♀	39,6	31,8	27,2	24,0	20,7	40,5	31,0	30,0
Hb_E pg		30,3	30,0	29,2	26,9	27,8	33,5	28,0	39,0
MCV μ^3		86,5	89,3	90,0	84,7	83,5	100,0	81,0	115,3
Kreatinin mg %		-	6,9	10,9	9,6	13,6	-	-	-
Harnstoff-N mg %		-	80,0	50,0	86,7	97,8	-	-	-
Folsäure im Plasma ng/ml		8,3	5,1	4,3	4,4	60,0	4,6	4,3	4,8
Folsäure in den Erythroz. ng/ml		459	359	365	431	1751	472	337	423
Vitamin B_{12} im Plasma pg/ml		705	749	722	660	732	753	1960	190

Tabelle 2: Klinisch-chemische Befunde der untersuchten Patienten und Normalpersonen

Für die chronisch Niereninsuffizienten im Stadium der kompensierten Retention (Gruppe II a) beträgt der durchschnittliche Creatininwert im Serum 6,9 mg %, die Konzentration des Harnstoff-Stickstoff 80 mg %. Das kleine Blutbild zeigt bei 25 der 31 Patienten eine normochrome, normozytäre Anämie. 3 Patientinnen, G. H., S. Sp. und R. F. zeigen keine Anämie, wobei bemerkenswert ist, daß die Patientin S. Sp. einen latenten Folsäuremangel aufweist. Der Patient W. G. hat eine ausgeprägte, der Patient W. T. eine angedeutete hyperchrome, makrozytäre Anämie. Bei beiden Patienten liegen die Vitamin-Konzentrationen im Normbereich. W. G. wird nach einer Nierentransplantation vor 8 Jahren mit dem Purinantagonisten Azathioprin behandelt. Der Patient D. K. hat eine hypochrome, mikrozytäre Anämie.

Für die gesamte Gruppe betragen die Werte des kleinen Blutbildes im Durchschnitt: Hb (Männer) 9,4 g %, Hb (Frauen) 10,4 g %, Hkt (Männer) 28,3 %, Hkt (Frauen) 31,8 %, Hb_E 30,0 pg, MCV 89,3 μ^3. Die Folsäurekonzentration im Plasma liegt mit einem Mittelwert von 5,1 ng/ml signifikant ($p < 0,01$) unter dem Wert der Normalpersonen. Der empirische Median beträgt 4,9 ng/ml, so daß bei 16 Patienten ein latenter Folsäuremangel vorliegt. Die Folsäurekonzentration der Erythrozyten ergab im Durchschnitt 359 ng/ml Erythrozyten und liegt ebenfalls signifikant ($p < 0,01$) unter dem Wert der Normalgruppe. Die Konzentration des Vitamin B_{12} im Plasma liegt mit 749 pg/ml im Normbereich. Es ließ sich mit $R = - 0,492$ eine signifikante ($p < 0,01$), negative Korrelation zwischen

der Creatininkonzentration im Serum als Grad der Niereninsuffizienz und der Hämoglobinkonzentration des Blutes als Grad der Anämie feststellen. Zwischen der Dauer der Niereninsuffizienz in Monaten und dem Folsäuregehalt im Plasma besteht eine nicht signifikante, negative Korrelation. Die Creatininkonzentration des Serum und der Folsäuregehalt im Plasma korrelieren nicht.

Die Heimdialysepatienten (Gruppe II b) zeigen eine durchschnittliche Creatininkonzentration im Serum von 10,9 mg %. Der Harnstoff-Stickstoff beträgt 50 mg %. Die Durchschnittswerte des kleinen Blutbildes betragen für diese Patienten: Hb (Männer) 9,0 g %, Hb (Frauen) 8,0 g %, Hkt (Männer) 28,2 %, Hkt (Frauen) 27,2 %, Hb_E 29,2 pg und MCV 90,0 μ^3. 11 Patienten haben eine normochrome, normozytäre Anämie. 3 Patienten, M. B., Ho. und K. H. weisen eine hyperchrome, makrozytäre Anämie auf. Die Folsäurekonzentration des Plasmas liegt bei dem Patienten M. B. im Mangelbereich, bei der Patientin Ho. im intermediären Bereich. Leider konnte bei diesen 3 Patienten die Vitamin B_{12}-Konzentration nicht gemessen werden, so daß die Ursache der Anämie dieser Patienten letztlich nicht abgeklärt ist.
Die Folsäure-Konzentration im Plasma liegt bei dieser Gruppe mit 4,3 ng/ml im intermediären Bereich, signifikant ($p < 0,01$) unter dem entsprechenden Wert der Normalpersonen, jedoch nicht signifikant unter dem Wert für die chronisch

Niereninsuffizienten im Stadium der kompensierten Retention. Die Konzentration in den Erythrozyten beträgt 365 ng/ml und liegt damit signifikant ($p < 0,01$) unterhalb des Wertes der Normalpersonen. Die Messung der Vitamin B_{12}-Konzentration im Plasma ergab 722 pg/ml. Die beiden letzten Werte sind kaum verschieden von denen der Patienten aus Gruppe II a.

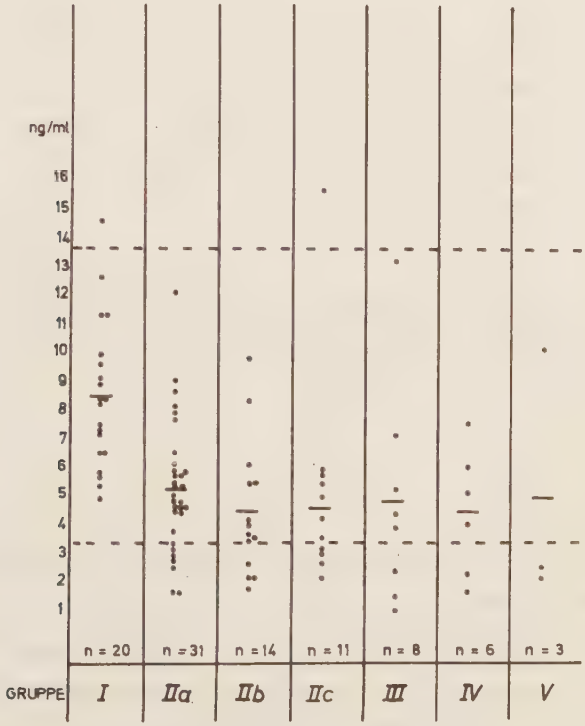

Abb. 8: Folsäure im Plasma

Abb. 9: Vitamin B_{12} im Plasma

Die Patienten der Klinikdialyse (Gruppe II c) haben wie die anderen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stark pathologische Nierenwerte. Die Creatininkonzentration beträgt im Durchschnitt 9,6 mg %, die Konzentration des Harnstoff-Stickstoff 86,7 mg %. Zwei dieser Patienten, K. B. und H. R., haben eine hypochrome, mikrozytäre Anämie, bei den anderen ist die Anämie normochrom und normozytär. Insgesamt

ergeben sich folgende Durchschnittswerte für die 11 Patienten: Hb (Männer) 7,9 g %, Hb (Frauen) 7,6 g %, Hkt (Männer) 24,8 %, Hkt (Frauen) 24,0 %, Hb_E 26,9 pg, MCV 84,7 μ^3. Die Folsäurekonzentration im Plasma liegt mit 4,4 ng/ml im intermediären Bereich, signifikant ($p < 0,01$) unter dem entsprechenden Wert für die Normalpersonen. Die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten entspricht mit 431 ng/ml der Norm, wie auch der Vitamin B_{12}-Gehalt im Plasma mit 660 pg/ml.

Abb. 10: Folsäure in den Erythrozyten

Von den 11 Patienten der Klinikdialyse, die unter regelmäßiger Folsäuremedikation standen (Gruppe II d), haben 8 eine normochrome, normozytäre Anämie. Bei 3 Patienten, R. M., W. M. und W. K., ist die Anämie hypochrom und mikrozytär. Es sind folgende Durchschnittswerte für diese Patienten errechnet worden: Hb (Männer) 7,8 g %, Hb(Frauen) 7,1 g %, Hkt (Männer) 24,0 %, Hkt (Frauen) 20,7 %, Hb_E 27,8 pg und MCV 83,5 μ^3. Die Creatininkonzentration beträgt im Mittel 13,6 mg %, die Konzentration des Harnstoff-Stickstoff 97,8 mg %. Die Folsäurekonzentration im Plasma beträgt 60,0 ng/ml und liegt damit, wie es nach der Medikation zu erwarten war, wesentlich über dem Normbereich. Nicht so exessiv hoch, jedoch immer noch signifikant ($p < 0,01$) über dem Normbereich liegt der Wert für die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten, der 1.751 ng/ml beträgt. Die Vitamin B_{12}-Konzentration beläuft sich auf 732 pg/ml.

Bei 15 Patienten der Klinikdialyse ist der Abfall der Folsäurekonzentration im Plasma unter der Dialyse berechnet worden. Es haben sich stark unterschiedliche Folsäureverluste durch die Dialysiermembran ergeben. Sie betragen bis 66,1 % der Folsäurekonzentration vor der Dialyse für die Patienten ohne und mit Folsäuremedikation aus den Gruppen II c und II d. Absolut haben sich Verluste bis 37 ng/ml ergeben. Der durchschnittliche Verlust beträgt 31,8 % bzw. 15 ng/ml. Für die Patienten ohne vorausgegangene Folsäuremedikation ist

ein Absinken der Folsäurekonzentration um 29,2 % bzw. 2,9 ng/ml Plasma errechnet worden. Die Patienten mit vorheriger Folsäureeinnahme, deren Konzentration des Vitamins im Plasma ausnahmslos über dem Normbereich lag, haben im Mittel während der Dialyse 32,8 % bzw. 19,4 ng Folsäure pro ml Plasma verloren.

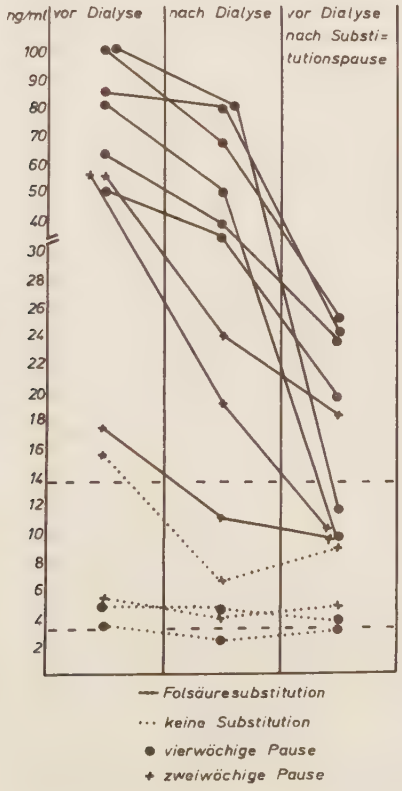

Abb. 11: Klinikdialyse - Folsäure im Plasma

Es ist weiterhin bei 13 Patienten, 4 aus Gruppe II c und 9 aus Gruppe II d, das Absinken der Folsäurekonzentration im Plasma während einer 2- bzw. 4-wöchigen Einnahmepause für Folsäurepräparate bestimmt worden. Die durchschnittliche Abnahme betrug für 6 Patienten, die vorher regelmäßig 4 mg Folsäure pro Tag eingenommen hatten, nach vierwöchiger Pause 74,4 % der Ausgangskonzentration. Bei zwei Patienten ohne Folsäureapplikation sank der Gehalt im Plasma um 12,8 % innerhalb von vier Wochen. Um 25,0 % sank er bei 2 Patienten ohne Folsäureeinnahme über einen Zeitraum von zwei Wochen. 3 Patienten mit regelmäßiger Folsäureeinnahme von 4 mg/d hatten nach zweiwöchiger Einnahmepause einen um 64,3 % niedrigeren Folsäuregehalt im Plasma. Es bleibt zu erwähnen, daß von den 9 Patienten, die nach regelmäßiger Folsäureeinnahme eine Applikationspause einlegten, am Ende der zwei- bzw. vierwöchigen Pause 4 Patienten Folsäurekonzentrationen im Plasma aufwiesen, die dem Normbereich entsprachen. Kein Patient geriet in einen Folsäuremangelzustand (siehe Abbildung 11).

Die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten während der Dialyse und der Substitutionspause verhält sich nicht so eindeutig wie diejenige im Plasma (siehe Abbildung 12). Bis auf 2 Patienten zeigte sich während der Dialyse ein Absinken der Werte, das später noch diskutiert wird. Nach der Substitutionspause fanden sich nur unwesentliche Schwankungen der Werte.

Bei 11 von 13 Patienten lag die Veränderung der Folsäurekonzentration in den Erythrozyten zwischen einer Abnahme von 21 % und einer Zunahme von 24 %. Zwei Patienten jedoch, die Ausgangswerte im Normbereich hatten, zeigten einen Abfall der Konzentration um 47 % bzw. 70 %. Ein Patient geriet hierdurch in den Zustand eines Folsäuremangels.

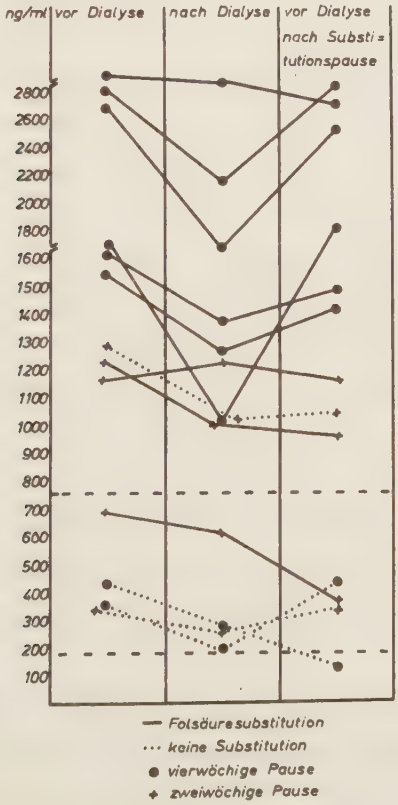

Abb. 12: Klinikdialyse - Folsäure in den Erythrozyten

Für die Patienten mit chronischem Alkoholabusus (Gruppe III) konnten folgende durchschnittlichen Blutwerte gemessen werden: Hb (Männer) 10,7 g %, Hb (Frauen) 13,3 g %, Hkt (Männer) 32,3 %, Hkt (Frauen) 40,5 %, Hb_E 33,5 pg, MCV 100 μ^3. Im einzelnen sind nur bei zwei der acht Patienten, J. H. und R. G., alle genannten Daten des kleinen Blutbildes im Normbereich. Die drei gemessenen Vitaminkonzentrationen entsprechen hier der Norm. 4 Patienten der Gruppe haben hyperchrome, makrozytäre Veränderungen im peripheren Blutbild. Ein Patient, P. T., hat dabei normale Folsäurekonzentrationen. Der Patient W. H. weist einen Folsäuremangel im Plasma auf, die Patientin E. Z. eine intermediäre Konzentration, und bei der Patientin L. St. besteht ein Folsäuremangel im Plasma bei einem Grenzwert für die Erythrozyten-Folsäure. Zwei weitere Patienten, die ein mormales peripheres Blutbild aufweisen, haben einen latenten Folsäuremangel. Die Vitamin B_{12}-Konzentrationen liegen bei allen 8 Patienten mit durchschnittlich 753 pg/ml im Normbereich. Die mittlere Folsäurekonzentration des Plasmas beträgt 4,7 ng/ml und ist damit signifikant ($p < 0,01$) niedriger als der entsprechende Wert bei den Normalpersonen. Die mittlere Folsäurekonzentration in den Erythrozyten ist mit 472 ng/ml nicht von dem Wert der Normalpersonen verschieden.

Bei den 6 Patientinnen mit myeloproliferativen Syndromen (Gruppe IV) fallen die hohen Vitamin B_{12}-Konzentrationen auf. Der durchschnittliche Wert beträgt 1.960 pg/ml und rangiert

damit signifikant ($p < 0,01$) über der Vitamin B_{12}-Konzentration der Normalpersonen. Nur zwei Patientinnen haben einen hoch normalen Vitamin B_{12}-Gehalt im Plasma. Eine Patientin mit Polycythämia vera hat einen latenten, zwei Patientinnen mit chronisch myeloischer Leukämie einen manifesten Folsäuremangel. Die Durchschnittswerte der Folsäurekonzentrationen betragen 4,3 ng/ml Plasma und 337 ng/ml Erythrozyten und liegen damit signifikant ($p < 0,01$) unter den entsprechenden Werten der Normalgruppe. 4 der 6 Patientinnen haben eine normochrome, normozytäre Anämie. Das kleine Blutbild ergab folgende Durchschnittswerte: Hämoglobin 10,7 g %, Hämatokrit 31 %, Hb_E 28 pg, MCV 81 μ^3.

Die 3 Patienten mit dem Vitamin B_{12}-Mangel im Plasma (Gruppe V) haben alle eine hyperchrome, makrozytäre Anämie. Im Durchschnitt beträgt das Hb_E 39 pg, das MCV 115,3 μ^3, das Hämoglobin sowie der Hämatokrit für den Mann 10,2 g % bzw. 32 % und für die beiden Frauen 10,3 g % bzw. 30 %. Der Vitamin B_{12}-Gehalt beträgt 180, 190 und 200 pg/ml Plasma und rangiert damit signifikant ($p < 0,01$) unter dem Vitamin B_{12}-Gehalt der Normalgruppe. 2 Patienten haben einen pathologischen Schillingtest, eine weitere Patientin zeigte eine Vitiligo. Bei einem Patienten lagen neurologische Symptome im Sinne einer funikulären Spinalerkrankung vor. 2 Patienten haben einen latenten Folsäuremangel. Im Durchschnitt betragen die Folsäurekonzentrationen 4,8 ng/ml Plasma und 423 ng/ml Erythrozyten.

E. Diskussion

Die Auswahl der Patienten und Zusammenstellung der Gruppen erfolgte außer nach den vorher bereits genannten Kriterien zufällig. Die Gruppen der Nierenpatienten sind ausreichend groß, um eine statistische Aussage über die Vitamin-Konzentrationen zu machen. Bei den anderen Patientengruppen wurden wegen der kleinen Zahl die erhobenen Werte beschrieben. Die Patienten mit hämatologischen Symptomen wurden in die Arbeit aufgenommen, um zu zeigen, daß die hier angewandte Methode der Vitamin B_{12}-Bestimmung hohe und niedrige Werte sicher mißt. Die Ergebnisse bei den chronischen Alkoholikern erweitern das Spektrum der Patienten mit leichtem Folsäuremangel.

Die Antwort auf die anamnestische Frage nach der Vitaminapplikation ist nicht ohne Fehlerrisiko. Denn man kann heute Medikamente und Vitaminpräparate, die Folsäure und Vitamin B_{12} enthalten, wie z. B. Geriatrica, rezeptfrei in den Apotheken erhalten, und die meisten Patienten können über Handelsnamen und Bestandteile der Medikamente keine Auskunft geben.

Vitamin B_{12} wurde bei allen Patienten bestimmt, auch bei solchen, die keine pathologischen Werte bezüglich dieses Vitamins erwarten ließen. Man kann ansonsten keine exakte Aussage über den Folsäuregehalt in den Erythrozyten abgeben, da Vitamin B_{12} für den Transport der Folsäure in die

Erythrozyten nötig und mit dem Folsäuremetabolismus eng verknüpft ist. Nach Tisman und Herbert (55) ist Vitamin B_{12} für die Aufnahme von Methyltetrahydrofolsäure in die Gewebezellen erforderlich. Pteroylglutaminsäure wird ohne Vitamin B_{12} zwar noch in die roten Blutzellen aufgenommen, aber in geringerem Maße. Die Autoren (55) stellen in diesem Zusammenhang die Frage, ob das Vitamin B_{12} Coenzym eines membranständigen Enzyms sei. Bei einem Vitamin B_{12}-Mangel muß man also damit rechnen, daß hierdurch bedingt die Erythrozyten eine verminderte Folsäurekonzentration enthalten (2), (39).
Aus den Gruppen II a - III, in denen besonderer Wert auf die Bestimmung der Folsäurekonzentrationen gelegt wurde, sind deshalb Patienten mit einem Vitamin B_{12}-Mangel ausgeschlossen worden.

Beide hier angewandte Bestimmungsmethoden, die Folsäurebestimmung und die Messung der Vitamin B_{12}-Konzentration, zeigen eine genügende Reproduzierbarkeit (2), (3), vor allem, wenn man bedenkt, daß sich die Untersuchungen über 12 Monate erstreckten und alle vier bis acht Wochen ein neuer „Kit" verwandt wurde. Die Spezifität der Radioassays mit kompetitiver Proteinbindung ist gewährleistet. Nach Becton, Dickinson u. Co (2) wird die Kreuzreaktivität für Folsäure mit 100 %, für N_5-Methyl-THFS mit 100 % und für Folinsäure mit 40 % angegeben. Amethopterin soll eine Kreuzreaktivität von 14 %, Aminopterin keine Kreuzreaktivität aufweisen. Es

erhielt jedoch kein Patient Folsäureantagonisten.
Chanarin (8) gibt an, daß bezüglich der hier untersuchten Vitamin-Konzentrationen keine Alters- oder Geschlechtsdifferenzen bekannt geworden sind. Dies wird durch die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigt. Es gibt in der Literatur keinen Hinweis darauf, daß die Folsäurekonzentrationen im Plasma und im Serum nennenswert differieren.
Der Normbereich für die Folsäurekonzentration im Plasma wird nicht überall gleich angegeben:
So bestimmten Dunn und Foster (10) mit der Radioassay- sowie mit der mikrobiologischen Lactobacillus casei-Methode einen Normbereich von 5 - 21 ng/ml. Waxman et al. (56) kamen auf das gleiche Ergebnis, wogegen Herbert (22) 7 - 16 ng/ml als Normbereich angab. Mit mikrobiologischen Methoden, die nach Dunn und Foster (10) mit dem Radioassay vergleichbar sind, maßen Magnus (35) und Wu et al. (61) Normalbereiche von 3 - 11 bzw. 2 - 20 ng/ml. Die gute Korrelation zwischen Radioassays mit ^{3}H als Marker und solchen mit ^{125}J, die von Becton, Dickinson und Co. (2) erwähnt wird, findet sich bei Kubasik et al. (27) nicht bestätigt. Diese Autoren erhielten mit ^{125}J „Kits" niedrigere Ergebnisse als mit dem ^{3}H-Assay. Heilmann et al. bestimmten mit einem ^{3}H Radio-Assay einmal 6,8 ng/ml als Mittelwert eines Normalkollektivs (17), ein anderes Mal 7,2 ng/ml (18) und in ihrer jüngsten Untersuchung mit einem ^{125}J-Assay 7,05 $\pm$ 3,4 ng Folsäure/ml Plasma (19). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung liegen etwas höher und weisen vor allem eine geringere Standardabweichung auf. Auch bei den Folsäurekonzentrationen in den

Erythrozyten, die gut mit dem Folsäuregehalt im Plasma korrelieren, konnten in der Normalgruppe, verglichen mit dem Wert von 387 ± 215 ng/ml Erythrozyten von Heilmann et al. (19), etwas höhere Werte bei niedrigerer Standardabweichung gemessen werden. Mortensen (39) gibt die Untergrenze der normalen Erythrozytenfolsäure-Konzentration mit 250 ng/ml an. Rothenberg et al. (48) bestimmten in ihrem Zwei-Phasen-Radioassay einen Normbereich von 210 ± 57 ng/ml Erythrozyten. Die erwähnten differenten Normbereiche sind möglicherweise zum einen methodisch begründet, zum anderen können sie mit einer regional unterschiedlichen Ernährungsweise zusammenhängen. Es ist deshalb wichtig, daß jede Klinik, die Folsäurebestimmungen ausführt, ihren eigenen Normbereich erstellt.

Die Definition des latenten und des manifesten Folsäuremangels, wie sie bei den Ergebnissen beschrieben wurde, findet sich mit fast identischen Grenzwerten bei Heilmann et al. (19), Chanarin (8) sowie bei Roetz und Merker (46). Entscheidend für die Ausprägung des Folsäuremangels ist die normale oder pathologische Konzentration in den Erythrozyten (8), (37), (23). Roetz und Merker (46) erwähnen, daß bei einem manifesten Folsäuremangel in der Regel hämatologische Symptome vorhanden sind, die zu einem latenten Mangel noch nicht gehören.

Die Konzentration des Vitamin B_{12} bei den „Normalpersonen" ist weitgehend identisch mit Literaturangaben über Vitamin B_{12}-Normbereiche, die mit Radioassays bestimmt wurden. Herbert (22) sowie Pierce und Hillmann (42) geben 200 -

900 pg/ml Plasma an, Neumann (40) berichtet über einen Normbereich von 250 - 1.000 pg/ml.

Die Patientengruppen mit chronischer Niereninsuffizienz haben alle, egal, ob dialysiert oder noch im kompensierten Stadium, erniedrigte Folsäurekonzentrationen im Plasma. Bei den beiden Dialysegruppen ohne Folsäuresubstitution (Gruppe II b und II c) liegen die Werte im intermediären Bereich, das bedeutet, daß ein latenter Folsäuremangel vorliegt. Bei den Patienten im Stadium der kompensierten Retention liegt der Mittelwert dicht an der unteren Grenze der Norm, jedoch verdeutlicht der empirische Median, daß 51 % dieser Patienten Werte im pathologischen bzw. im intermediären Bereich aufweisen. Die Folsäurekonzentrationen im Plasma der Patienten der Klinik- und Heimdialyse unterscheiden sich von denen der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention nicht signifikant.
Weshalb zeigt nun kein Patient aus den Gruppen II a - II c eine entsprechende hyperchrome, makrozytäre Anämie?
Das liegt zum einen daran, daß bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz häufig ein latenter, aber nur sechsmal ein manifester Folsäuremangel vorliegt. Von diesen 6 Patienten haben 4 keine entsprechende Anämie, einer zeigt sie in leichter Ausprägung, und eine Patientin hat aufgrund eines zusätzlichen Fe-Mangels eine hypochrome, mikrozytäre Form.
Zum anderen besteht der Folsäuremangel, ob latent oder mani-

fest, vermutlich nicht lange genug, um sich in hämatologischen Symptomen zu äußern. Laut Streiff (54) sowie Roetz und Merker (46), die sich auf einen Versuch Herberts aus dem Jahre 1963 berufen, findet man zwei bis drei Wochen nach Beginn einer Folsäure-Mangeldiät subnormale Folsäurekonzentrationen im Plasma. Die Erythrozyten-Folsäure ist erst nach 17 Wochen reduziert, und nach 20 Wochen beginnt sich eine makrozytäre Anämie auszubilden. Eine hyperchrome, makrozytäre Anämie weist bei normaler Vitamin B_{12}-Konzentration in der Regel auf einen starken, lange bestehenden Folsäuremangel hin.

Die renale Anämie läßt sich durch Dauerdialyse nur unwesentlich bessern. Einige Autoren haben in den letzten Jahren erkannt, daß das Folsäuremolekül im Gegensatz zum stärker eiweißgebundenen Cobalaminmolekül (59) dialysabel ist und die Dialysepatienten daher einen erheblichen Folsäureverlust erleiden. Lasker et al. (30) wiesen 1963 als erste auf erniedrigte Folsäurewerte bei Dauerdialysepatienten hin und sprachen von einer Korrelation des Folsäuremangels zur Dauer der chronischen Niereninsuffizienz und zum Folsäuregehalt der Nahrung. Seit dieser Zeit haben mehrere Autoren auf Folsäureverluste bei Patienten mit Dauerdialysebehandlung hingewiesen. Nach Mackenzie et al. (34) fällt die Folsäurekonzentration bei Dialysepatienten regelmäßig. Die Folsäureclearance während der Dialyse beträgt 25 ml/min, so daß ein Folsäureverlust pro Dialyse von 30 - 150 ng resultiert (34). Hampers et al. (16) fanden 1967 in vitro zwei Halbwertszeiten, 14 und 51 Minuten, für den Folsäureverlust durch die Dialysier-

membran. Nach Goresky et al. (15) beträgt die Folsäureclearance in einer langsamen Eliminationsphase 51 ml/min. Whitehead et al. (60) sowie Joist et al. (24) vertreten die Meinung, daß sich die Folsäureverluste in Grenzen halten und durch die Diät ausgeglichen werden können. Sie fanden mit einer mikrobiologischen Methode 0,3 ng Folsäure pro ml Dialysat. Meyer et al. (37) konnten mittels eines Radioassays bei Dialysepatienten ausnahmslos auf unter 5 ng/ml erniedrigte Folsäurekonzentrationen im Plasma messen.

In der vorliegenden Untersuchung ist keine wesentliche Differenz der Hämoglobin- und Hämatokritwerte zwischen den Klinikdialysepatienten ohne und denen mit regelmäßiger Folsäuremedikation festzustellen. An der Ausbildung und dem Grad der renalen Anämie dürfte ein latenter Folsäuremangel danach also nicht vorrangig beteiligt sein. Daß die Hämoglobin-Konzentration der chronisch Niereninsuffizienten signifikant mit der Creatininkonzentration im Serum korreliert, beweist die Abhängigkeit der renalen Anämie vom Grad der chronischen Niereninsuffizienz. Es ist aber von Bedeutung, daß die in dieser Arbeit untersuchten Dialysepatienten noch nicht sehr lange dialysiert wurden. Es konnte eine schwache, nicht signifikante Korrelation zwischen der Dauer der chronischen Niereninsuffizienz und dem Folsäuregehalt im Plasma errechnet werden, wobei zu berücksichtigen ist, daß sich die Dauer der Niereninsuffizienz häufig nicht exakt festlegen läßt und eine

Reihe weiterer Faktoren die Folsäurekonzentration beeinflussen. Man darf annehmen, daß sich der Folsäuremangel mit der Gesamtdauer der Dialysetherapie verstärkt, da die endogenen Folsäurespeicher immer stärker entleert werden und das Folsäuredefizit dann nicht mehr mit der Folsäureaufnahme durch die Nahrung, die ohnehin vermindert ist, wie später ausgeführt wird, kompensiert werden kann. Der latente Folsäuremangel stellt eine Teilursache der renalen Anämie dar (37). Wie Hampers et al. (16) angeben ist die Rolle des Folsäuremangels bei der Entwicklung der renalen Anämie nicht genau geklärt. Zweifellos stellt er einen limitierenden Faktor für die Erythropoese dar, die bei der chronischen Niereninsuffizienz ohnehin durch das verminderte Erythropoitin und die urämischen Substanzen gehemmt wird. Da alle Dialysepatienten bereits an einer renalen Anämie leiden und niedrige Folsäurewerte im Plasma nachgewiesen sind, ist eine maßvolle medikamentöse Folsäuresubstitution zu befürworten, um sicherzugehen, daß nicht bei längerer Dialyse ein klinisch manifester Folsäuremangel entsteht, der die Gesamtsituation des chronisch Kranken noch verschlechtern würde. Unter „maßvoll" werden tägliche Gaben von 0,5 bis 1,0 mg verstanden, wie sie auch in den Arbeiten von Roetz und Merker (46) und Skoutakis et al. (53), Kopple und Swendseid (26), Meyer et al. (37) sowie von der Food und Drug Association (1970) erwähnt werden. Bei höherer Dosierung entsteht laut Roetz und Merker (46) die Gefahr der Maskierung einer eventuell auftretenden perniziösen Anämie.

Blumberg (5) und Whitehead et al. (60) vertreten die Meinung, daß eine adäquate Diät ausreichend sei, während Kopple und Swendseid (26) in der Diät von Dialysepatienten einen zu niedrigen Folsäuregehalt nachweisen konnten, um eine erniedrigte Folsäurekonzentration wieder in den Normbereich zurückzubringen. Hampers et al. (16) erachten ebenfalls eine Folsäuresubstitution für sinnvoll.

Bezüglich der Vitaminkonzentrationen unterscheiden sich die Heimdialysepatienten nicht wesentlich von den in der Klinik dialysierten Patienten. Nun werden jedoch die ersteren durchschnittlich seit 18 Monaten dialysiert, wogegen die letzteren im Mittel erst seit vier Monaten dialysiert werden. Es ist leicht vorstellbar, daß die häusliche Nahrung für den Nierenkranken abwechslungsreicher und vitaminhaltiger zubereitet wird, wodurch der Folsäuregehalt des Heimdialysepatienten länger im Gleichgewicht bleibt. Betrachtet man die Werte des kleinen Blutbildes, so sieht man, daß Heimdialysepatienten leicht bessere Hämoglobin- und Hämatokritwerte haben. Es besteht jedoch ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Patienten der Klinik- und Heimdialyse in der Art, daß die Patienten der Klinikdialyse wesentlich häufiger Komplikationen ihrer Krankheit und Begleitkrankheiten aufweisen, die sich nachteilig auf den Folsäurehaushalt und das Blutbild auswirken.

Die Dialysepatienten in dieser Klinik, die täglich 4 mg Folsäure erhielten (Gruppe II d), zeigten alle Folsäurekonzen-

trationen im Plasma, die über der oberen Normgrenze lagen, ja teilweise die zehnfache Normalkonzentration erreichten. Damit ist ersichtlich, daß eine Substitution von 4 mg Folsäure/d den täglichen Bedarf auch bei Dialyse weit übersteigt. Wie bereits erwähnt genügt 1 mg täglich über einige Wochen für die Behebung des Mangels und 0,5 - 1,0 mg/d für die Dauersubstitution während der Hämodialysebehandlung (46), (53). Die Zuverlässigkeit des Radioassay bei diesen exessiv hohen Werten wurde nicht kontrolliert.

Während der Dialyse und der Substitutionspause sanken die Folsäurekonzentrationen im Plasma kontinuierlich. Absolut fielen die Konzentrationen bei den Patienten am stärksten, die den höchsten Ausgangswert hatten. Der relative Abfall während der Dialyse schwankte sehr stark, war jedoch im Durchschnitt bei den Patienten mit und ohne Folsäureeinnahme fast identisch, 31,8 %. Whitehead et al. (60) konnten während der Dialyse einen Abfall der Folsäurekonzentration im Plasma von 51 % messen. Während der Applikationspause war die relative Abnahme der Folsäurekonzentration im Plasma deutlich stärker bei den Patienten mit vorheriger Folsäuresubstitution gegenüber jenen, die keine Folsäurepräparate erhalten hatten. Sobald die Untergrenze des Normalbereichs der Folsäurekonzentration im Plasma erreicht war, fiel der Folsäuregehalt zwar noch kontinuierlich, jedoch wesentlich langsamer. Die Diskussion des Verhaltens der Erythrozytenfolsäure während der Dialyse gestaltet sich schwierig, da der Hämatokrit nur vor der Dialyse gemessen und dieser Wert für die Berech-

nung der Folsäurekonzentration in den Erythrozyten vor und nach der Dialyse herangezogen wurde. Während der Dialyse verändert sich der Hämatokrit unterschiedlich. Für den Abfall der Folsäurekonzentration in den Erythrozyten bei der Mehrzahl der Patienten während der Dialyse sind zwei Erklärungen denkbar. Zum einen kann sich der Hämatokritwert während der Dialyse erniedrigt haben. Der Hämatokrit erscheint bei der Berechnung der Folsäurekonzentration in den Erythrozyten im Nenner der Formel (siehe Seite 23). Zum anderen kann es zu einem echten Absinken der Folsäurekonzentrationen in den Erythrozyten gekommen sein. Letzteres erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, zumal die Konzentrationen nach der Substitutionspause vor der Dialyse fast identisch mit denen waren, die vor der Substitutionspause am Beginn der Dialyse gemessen wurden. Heilmann et al. (18) fanden ebenfalls, daß die intraerythrozytären Folsäurewerte vor und nach der Dialyse nicht signifikant voneinander abwichen. Nur bei zwei von 13 Patienten war die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten nach der Substitutionspause von zwei oder vier Wochen deutlich niedriger als vorher.
Die Folsäurekonzentration des Plasmas repräsentiert die aktuelle Folsäurebilanz, wogegen die Konzentration in den Erythrozyten den langfristigen Folsäurehaushalt widerspiegelt (46), (54).

Wie an der Patientengruppe mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention deutlich wird,

die im Vergleich zur Normalgruppe signifikant niedrigere Folsäurewerte zeigt, ist die Dialyse nicht allein für eine erniedrigte Folsäurekonzentration im Plasma verantwortlich. Diese Beobachtung wird auch in der Literatur (16) häufig gesehen. Paine et al. (41) fanden bei 10 % der chronisch Niereninsuffizienten erniedrigte Folsäurekonzentrationen im Plasma. Das Phänomen erklärt sich aus der Tatsache, daß es sich bei diesen Patienten um chronisch Kranke handelt, deren Leiden mit Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen einhergeht. Hampers et al. (16) geben an, daß die Azotämie und die spezielle Diät ursächlich hierfür in Frage kommen. Einige Autoren weisen darauf hin, daß auch bei anderen chronisch Kranken oder hospitalisierten Patienten niedrige Folsäurewerte gemessen werden können (41), (39).

Chanarin (8) fand bei jedem dritten geriatrischen Patienten niedrige Folsäurewerte im Vollblut. Das bedeutet, daß die Folsäurekonzentrationen der chronisch Niereninsuffizienten, die im Mittel an der unteren Grenze zum intermediären Bereich liegen, nicht mit der Niereninsuffizienz ursächlich in Zusammenhang stehen, sondern mit der Chronizität der Krankheit und der Ernährungsform der Patienten.

Die Vitaminzufuhr mit der Nahrung ist durch die Appetitlosigkeit, durch unsachgemäße Kochmethoden und durch das Meiden des Obstes wegen eines eventuellen Kaliumüberschusses häufig vermindert. Es erwies sich als sehr schwierig, die Folsäure in der Nahrung zu bestimmen (46). Bei den nicht dialysierten Patienten ist eine Folsäuresubstitution im all-

gemeinen nicht notwendig (41). Es ist jedoch wichtig, darauf zu achten, daß diese Kranken eine Nahrung bekommen, die besonders bezüglich des Folsäuregehaltes vollwertig ist (5). Beim Auftreten einer hyperchromen, makrozytären Anämie sollte man nicht nur an einen Vitamin B_{12}-Mangel, sondern auch an einen Folsäuremangel denken und die Folsäurekonzentration im Plasma und in den Erythrozyten messen.

Ähnlich wie die Patienten der Gruppe II a weisen die Patienten mit chronischem Alkoholabusus eine intermediäre Folsäurekonzentration im Plasma auf, die signifikant unterhalb der Konzentration der Normalpersonen liegt. Der Gehalt in den Erythrozyten liegt genau wie die Vitamin B_{12}-Konzentration des Plasmas im Normbereich. Diese Daten, sowohl die erniedrigte Plasmafolsäure, als auch die normale Folsäurekonzentration in den Erythrozyten, werden von Heilmann et al. (19) bestätigt. Einige Autoren (54), (61), (47) diskutieren die vitaminarme, wenig abwechslungsreiche Ernährung als Ursache dieses Folsäuremangels. Chronische Alkoholiker decken ihren Joulebedarf überwiegend durch den Alkohol, wodurch zwangsläufig ein Folsäuredefizit entsteht. Eine weitere Rolle spielt möglicherweise die Appetitlosigkeit, hervorgerufen durch die chronische Gastritis, die bei vielen dieser Patienten vorliegt. In fortgeschrittenen Stadien des Alkoholismus ist auch durch das Absinken im sozialen Status und die Lethargie der Patienten eine qualitativ schlechte Ernährung zu erklären. Entscheidender als die tägliche Alkoholmenge

oder das Ausmaß des Leberschadens ist die Art des Getränkes. Nach Wu et al. (61) haben Wein- und Schnapstrinker eine niedrigere Folsäurekonzentration als Biertrinker, da Bier selbst Folsäure enthält. Streiff (54) erwähnt, daß Alkohol den Folsäuremetabolismus hemmt, laut Lane et al. (29) wird durch den Alkohol die Freisetzung der Folsäure aus den Gewebespeichern gedrosselt. Rosenberg (47) fand bei seinen Untersuchungen, daß die Protein- und Folsäurearmut der Nahrung des Alkoholikers mit der Zeit zu morphologischen und funktionellen Darmveränderungen führt, so daß zur Malnutrition noch eine Malabsorptionskomponente hinzukommt. Bei den 8 Patienten zeigten sich sowohl solche mit einem Folsäuremangel ohne makrozytäre, hyperchrome Anämie, als auch solche, die bei einer megaloblastären Anämie normale Folsäurekonzentrationen aufwiesen. Bei der ersten Gruppe ist der Alkoholabusus wahrscheinlich noch nicht lange genug existent, ein Faktor, der schlecht zu eruieren ist. Bei der zweiten Gruppe erlangt möglicherweise die direkte toxische Wirkung des Alkohols auf das hämatopoetische System Bedeutung; Wu et al. (61). Von zwei Patienten mit makrozytärer, hyperchromer Anämie weist einer einen latenten und eine Patientin einen manifesten Folsäuremangel auf. Es ist somit indiziert, bei chronischen Alkoholikern mit entsprechenden hämatologischen Symptomen Folsäure- und Vitamin B_{12}-Bestimmungen durchzuführen und bei intermediären oder pathologischen Werten unter anderem auf adäquate Diät zu achten bzw. die Folsäure zu substituieren.

Keiner der Patienten in den untersuchten Gruppen hat Diphenylhydantoin oder orale Kontrazeptiva eingenommen, Medikamente, die nach Rosenberg (47) die Absorption von Folsäure beeinträchtigen sollen.

In der Literatur (13), (3) wird mehrfach beschrieben, daß Patienten mit myeloproliferativen Syndromen und solche mit Leberkrankheiten über die Norm hohe Vitamin B_{12}-Konzentrationen im Plasma aufweisen. Konzentrationen über 1.250 pg/ml kommen bei Patienten mit Leberschäden vor (32), auf über 4.000 pg/ml kann die Konzentration bei myeloproliferativen Syndromen ansteigen. Gilbert et al. (13) weisen auf die Bedeutung der Vitamin B_{12}-Bestimmung im Plasma in der Differentialdiagnose und für die Beurteilung der myeloproliferativen Syndrome hin, hier insbesondere für die Abgrenzung der Polyzythämia vera. Der Bestimmung der ungesättigten Vitamin B_{12}-Bindungskapazität - die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist - soll eine noch größere Aussagekraft zukommen, und sie soll besonders gut mit der Antwort der Krankheit auf die myelosuppressive Therapie korrelieren (13).
Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die hohen Vitamin B_{12}-Konzentrationen, obwohl die 6 Patientinnen von den Diagnosen her sehr heterogen zusammengesetzt sind. Die Folsäurekonzentrationen sind im Plasma und den Erythrozyten signifikant erniedrigt, was auf einen erhöhten Bedarf durch die Krankheit hinweisen könnte. Nach Ratanasthien et al. (43) besitzen Ge-

webe mit hoher Zellneubildungsrate einen erniedrigten Gehalt an Gesamtfolsäure und N_5-Methyl-THFS, dagegen eine erhöhte N_{10}-Formyl-THFS-Konzentration. Bei einer Patientin, F. St. (siehe Seite 11), spielt außerdem zusätzlich die begleitende chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention für die niedrige Folsäurekonzentration eine Rolle.

Mit den Vitamin B_{12}-Messungen konnten ebenso die erniedrigten Konzentrationen im Plasma bei Patienten mit Vitamin B_{12}-Mangel sicher bestimmt werden. Vitamin B_{12} ist einmal für den Transport der Folsäure in die Erythrozyten erforderlich (55), zum anderen um Folsäure intrazellulär in der wirksamen Form bereitzustellen bzw. von N_5-Methyl-THFS zu THFS zu regenerieren (3), (20), (51), (40). Zwangsläufig werden somit bei einem Vitamin B_{12}-Mangel erhöhte Folsäurekonzentrationen im Plasma gefunden, während die Folsäurekonzentration in den Erythrozyten absinkt (55), (48), (23), (39), (8). Das und Herbert (9) sprechen von der „Methyl-THFS-Trap-Hypothese" und bringen damit zum Ausdruck, daß durch den B_{12}-Mangel auf der Stufe der Methyl-THFS im Folsäuremetabolismus ein Block eintritt, mit allen Folgen für die Zellneubildung. Die Purinsynthese und die Pyrimidin-Nucleotid-Biosynthese und somit die DNS-Synthese sistieren.
Der Vitamin B_{12}-Mangel äußert sich also über eine Störung im Folsäurestoffwechsel (9). Dadurch wird der enge Zusammenhang zwischen Vitamin B_{12}- und Folsäuremetabolismus sowie das weitgehend identische klinische Bild bei Mangelzuständen bei-

der Vitamine deutlich. Eine megaloblastäre Anämie entsteht immer durch einen Block der DNS-Synthese. Dieser Block entwickelt sich direkt durch einen Folsäuremangel oder indirekt durch einen Mangel an Vitamin B_{12}.

Bei den drei untersuchten Patienten mit megaloblastären Anämien infolge eines Vitamin B_{12}-Mangels konnte die oben geschilderte typische Konstellation der Folsäurekonzentration im Plasma und in den Erythrozyten nicht festgestellt werden. Chanarin (8) fand bei Perniziosa-Patienten in 60 % erniedrigte Erythrozyten- und erhöhte Serumfolsäurekonzentrationen. Möglicherweise liegt bei den Patienten der Gruppe V eine Kombination von Vitamin B_{12}- und Folsäuremangel vor, wie sie in 10 % der Fälle von B_{12}-Mangel gefunden wird (8).

F. Zusammenfassung

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Dialysepatienten, chronischen Alkoholikern und Patienten mit hämatologischen Erkrankungen sowie bei einer Normalgruppe wurde die Folsäurekonzentration im Plasma und in den Erythrozyten sowie die Vitamin B_{12}-Konzentration im Plasma gemessen. Zur Bestimmung dienten Radioassays mit dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindung nach vorangehender Hitzedenaturierung der endogenen Proteine. ^{125}J-Pteroylglutaminsäure wurde als markierte Folsäure, ^{57}Co zur Markierung des Vitamin B_{12}-Moleküls verwendet.

Bei den Normalpersonen ergab sich eine Folsäurekonzentration von 8,3 $\pm$ 2,57 ng/ml im Plasma, 459 $\pm$ 143 ng/ml in den Erythrozyten und eine Vitamin B_{12}-Konzentration von 765 $\pm$ 250 pg/ml Plasma. Hieraus wurden folgende Normbereiche ($\bar{x} \pm 2S$) errechnet:

Folsäure im Plasma:	3,2	-	13,5	ng/ml
Folsäure in den Erythrozyten:	175	-	750	ng/ml
Vitamin B_{12} im Plasma:	250	-	1.250	pg/ml

Eine Folsäurekonzentration im Plasma von 3,2 - 5,0 ng/ml ist als intermediärer Bereich gekennzeichnet worden. Ein latenter Folsäuremangel besteht bei pathologischen oder intermediären Folsäurekonzentrationen im Plasma, wogegen nur bei pathologischen Konzentrationen in Plasma und Erythrozyten von einem manifesten Folsäuremangel gesprochen wird.

31 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention zeigten gegenüber der Normalgruppe signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Folsäurekonzentrationen in Plasma und Erythrozyten bei normalen Vitamin B_{12}-Konzentrationen. 16 dieser Patienten hatten einen latenten Folsäuremangel, auf dessen klinische Bedeutung und Therapie in der Arbeit eingegangen wird.
Bei 14 Patienten der Heimdialyse und 11 Patienten, die in der Klinik dialysiert wurden, konnten signifikant ($p < 0,01$) erniedrigte Folsäurekonzentrationen im Plasma und bei den Heimdialysepatienten auch signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Konzentrationen in den Erythrozyten gemessen werden. Die Vitamin B_{12}-Konzentrationen waren normal. 64 % der Dialysepatienten hatten einen latenten, 16 % einen manifesten Folsäuremangel, weshalb bei diesen Patienten eine tägliche Substitution von 0,5 - 1,0 mg Folsäure befürwortet wird. Bei einer weiteren Gruppe von Dialysepatienten wurde nach vorausgegangener Folsäuresubstitution der Abfall der Folsäurekonzentrationen im Plasma und in den Erythrozyten während der Dialyse und nach einer Substitutionspause gemessen.

Acht untersuchte Patienten mit chronischem Alkoholismus zeigten in 4 Fällen einen latenten, in einem Fall einen manifesten Folsäuremangel. Die Ursachen des Mangels, die Auswirkungen auf das hämatopoetische System und die erfor-

derliche Therapie wurden erörtert.

Sechs Patientinnen mit myeloproliferativen Syndromen zeigten signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Vitamin B_{12}-Konzentrationen, dagegen signifikant ($p < 0,01$) erniedrigte Folsäurekonzentrationen in Plasma und Erythrozyten. Die Bedeutung dieser Daten für die Diagnose wurde diskutiert.

Bei 3 Patienten mit klinisch nachgewiesenen Vitamin B_{12}-Mangelzuständen fanden sich erniedrigte Vitamin B_{12}-Konzentrationen.

G) Literaturverzeichnis

(1) Becker, J., H. M. Kuhn, W. Wenz, E. Willich: Kursus: Radiologie und Strahlenschutz. Berlin, Heidelberg, New York (1972), 8

(2) Becton, Dickinson & Co: Folate Radioassay Kit ^{125}J. New York (1976)

(3) Becton, Dickinson & Co: Vitamin B_{12} Radioassay Kit ^{57}Co. New York (1976)

(4) Ben Ari, J., A. Oren, G. M. Berlyne: Short Duration - High Area Regular Dialysis Using Two UF_2 Coils in Series. Nephron 16 (1976), 74

(5) Blumberg, A.: Die renale Anämie. Bern (1972)

(6) Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie. Berlin (1971^2)

(7) Caplan, R. H., K. Davis, B. Bengston, M. J. Smith: Serum Folate and Vitamin B_{12} Levels in Hypothyroid and Hyperthyroid Patients. Arch Intern Med 135 (1975), 701

(8) Chanarin, I.: The Assay And Concentration Of Folate In Blood And Other Tissues. In: The Megaloblastic Anaemias. Philadelphia (1969), 306

(9) Das, K. C., V. Herbert: Vitamin B_{12} - Folate Interrelations. Clin Haematol 5 (1976), 697

(10) Dunn, R. T., L. B. Foster: Radioassay of Serum Folate. Clin Chem 19 (1973), 1101

(11) Eichner, E. R., C. J. Paine, V. L. Dickson, M. D. Hargrove: Clinical and Laboratory Observations on Serum Folate - binding Protein. Blood 46 (1975), 599

(12) Gallagher, N. I., J. M. Mc Carthy, K. T. Hart, R. D. Lange: Evaluation of plasma erythropoietin - stimulating factors in anemic uremic patients. Blood 14 (1959), 662

(13) Gilbert, H. S., S. Krauss, B. Pasternack, V. Herbert, L. R. Wassermann: Serum Vitamin B_{12} Content and Unsaturated Vitamin B_{12} - Binding Capacity in Myeloproliferative Disease. Ann Intern Med 71 (1969), 719

(14) Givas, J., S. Gutcho: pH dependence of the binding of folates to milk binder in radioassay of folates. Clin Chem 21 (1975), 427

(15) Goresky, C. A., H. Watanabe, D. G. Johns: The renal excretion of folic acid. J Clin Invest 42 (1963), 1841

(16) Hampers, C. L., R. Streiff, D. G. Nathan, D. Snyder,

J. P. Merill: Megaloblastic Hematopoiesis In Uremia And In Patients On Long-Term Hemodialysis. New Engl J Med 276 (1967), 551

(17) Heilmann, E., E. Bönninghoff: Radioassay zur Folsäure-Bestimmung. Diagnostik 9 (1976), 347

(18) Heilmann, E., E. Bönninghoff, H. Korte, P. Tillmann, H. Herwig: Folsäure - Substitution bei Hämodialyse - Patienten. Fortschr Med 94 (1976), 2101

(19) Heilmann. E., E. Bönninghoff: Folsäurebestimmung im Serum und in den Erythrozyten mittels einer kompetitiven Proteinbindungsmethode mit 125 - Jod - Markierung. Schweiz Med Wochenschr 106 (1976), 1821

(20) Hegglin, R., W. Siegenthaler: Differentialdiagnose innerer Krankheiten. Stuttgart (1975^{13})

(21) Herbert, V.: Diagnostic and Prognostic Values of Measurement of Serum Vitamin B_{12}-Binding Proteins. Blood 32 (1968), 305

(22) Herbert, V.: B_{12} And Folate Analysis With Radionuclides. In: A. T. Gilson, W. B. Smoak, M. B. Weinstein: Hematopoietic and Gastrointestinal Investigations with Radionuclides. Springfield (1972), 95

(23) Hershko, C., N. Grossowicz, M. Rachmilewitz, S. Kesten, G. Isak: Serum and erythrocyte folates in combined iron and folate deficiency. Am J Clin Nutr 28 (1975), 1217

(24) Joist, J. H., A. Heller, U. Lüttringhaus, A. Walz, H. G. Sieberth: Zur Frage der Entwicklung und Bedeutung eines Folsäuremangels bei fortgeschrittener, chronischer Niereninsuffizienz. Klin Wochenschr 47 (1969), 861

(25) Joske, R. A., J. M. Mc Alister, T. A. J. Pankerd: Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. Clin Sci 15 (1956), 511

(26) Kopple, J. D., M. E. Swendseid: Vitamin nutrition in patients undergoing maintenance hemodialysis. Kidney Int (Suppl) 2 (1975), 79

(27) Kubasik, N. P., M. T. Volosin, H. E. Sine: Comparison of Commercial Kits for Radioimmuno assay: III. Radioassay of Serum Folate. Clin Chem 21 (1975), 1922

(28) Kuschinsky, G., H. Lüllmann: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. Stuttgart (1974^{6})

(29) Lane, F., P. Goff, R. Mc Guffin, E. R. Eichner, R. S.

Hillmann: Folic Acid Metabolism in Normal, Folate Deficient and Alcoholic Man. Br J Haematol 34 (1976), 489

(30) Lasker, N., A. Harvey, H. Baker: Vitamin Levels In Hemodialysis And Intermittent Peritoneal Dialysis. Trans Am Soc Artif Intern Organs (1963), 51

(31) Leonard, J. P., C. Beckers: Limits Of The Estimate Of Serum Folate - Binding Protein By Radioassay. Clin Chim Acta 70 (1976), 119

(32) Liu, Y. K., L. W. Sullivan: An Improved Radioisotope Dilution Assay for Serum Vitamin B_{12} Using Hemoglobin-coated Charcoal. Blood 39 (1972), 426

(33) Loge, J. P., R. D. Lange, C. V. Moore: Characterization of anemia associated with chronic renal insufficiency. Am J Med 24 (1958), 4

(34) Mackenzie, J. C., J. E. Ford, A. H. Waters, N. Harding, W. R. Cattel, B. B. Anderson: Erythropoiesis in patients undergoing regular dialysis treatment without transfusions. Proc Eur Dial Transplant Assoc 5 (1968), 172

(35) Magnus, E. M.: Folate Activity in Serum and Red Cells of Patients with Cancer. Cancer Res 27 (1967), 490

(36) Mann, D. L., E. M. Donati, N. I. Gallagher: Erythropoietin assay and ferrokinetic measurements in anemic uremic patients. J Am Med Assoc 194 (1965), 1321

(37) Meyer, G. J., W. Niedermayer: Folsäuresubstitution bei terminaler Niereninsuffizienz. Med Klin 72 (1977), 988

(38) Mitchell, G. A., S. P. Pochron, P. V. Smutny, R. Guity: Decreased Radioassay Values for Folate after Serum Extraction When Pteroylglutamic Acid Standards are Used. Clin Chem 22 (1976), 647

(39) Mortensen, E.: Determination of Erythrocyte Folate by Competitive Protein Binding Assay Preceded by Extraction. Clin Chem 22 (1976), 982

(40) Neumann, E.: Vitamin B_{12} - klinische Bedeutung und Bestimmungsmethoden. Med Lab 29 (1976), 184

(41) Paine, C. J., M. D. Hargrove, E. R. Eichner: Folic Acid Binding Protein and Folate Balance in Uremia. Arch Intern Med 136 (1976), 756

(42) Pierce, H. J., R. S. Hillmann: The Value of the Serum Vitamin B_{12} Level in Diagnosing B_{12} Deficiency. Blood 43 (1974), 915

(43) Ratanasthien, K., J. A. Blair, R. J. Leeming, W. T. Cooke, V. Melikian: Folates in human serum. J Clin Pathol 27 (1974), 875

(44) Retief, F. P., A. Du P. Heyns, M. Oosthuizen, O. R. v. Reenen, C. J. Badenhorst: In Vitro Binding of Folates by Body Fluids. Br J Haematol 32 (1976), 113

(45) Roetz, R., K. - P. Hampel: Veränderungen des Folatspiegels und der Eisensättigung des Serums bei Schwangeren. Teilergebnisse einer Längsschnittuntersuchung. Geburtshilfe Frauenheilkd 32 (1972), 1042

(46) Roetz, R., H. J. Merker: Die Bedeutung der Folsäure für Schwangerschaft und Entwicklung des Menschen. Therapiewch 22 (1972), 255

(47) Rosenberg, I. H.: Absorption and Malabsorption of Folates. Clin Haematol 5 (1976), 589

(48) Rothenberg, S. P., M. Da Costa, J. Lawson, Z. Rosenberg: The Determination of Erythrocyte Folate Concentration Using a Two - Phase Ligand - binding Radioassay. Blood 43 (1974), 437

(49) Rothenberg, S. P., M. Da Costa: Correspondence. Measurement Of Red Cell Folate Levels. Br J Haematol 29 (1975), 189

(50) Rothenberg, S. P., M. Da Costa: Folate Binding Proteins and Radioassay for Folate. Clin Haematol 5 (1976), 569

(51) Schettler, G.: Innere Medizin, Band I und II. Stuttgart (1976^4)

(52) Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie. Stuttgart (1973^2)

(53) Skoutakis, V. A., S. R. Acchiardo, M. C. Meyer, F. E. Hatch: Folic acid dosage for chronic hemodialysis patients. Clin Pharmacol Ther 18 (1975), 200

(54) Streiff, R. A.: Folic Acid Deficiency Anemia. Semin Hematol 7 (1970), 23

(55) Tisman, G., V. Herbert: B_{12} - Dependence of Cell Uptake of Serum Folate: An Explanation for High Serum Folate and Cell Folate Depletion in B_{12} Deficiency. Blood 41 (1973), 465

(56) Waxman, S., C. Schreiber, V. Herbert: Radioisotopic Assay for Measurement of Serum Folate Levels. Blood 38 (1971), 219

(57) Waxman, S., C. Schreiber: Measurement of Serum Folate Levels and Serum Folic Acid - binding Protein by ^3H - PGA Radioassay. Blood 42 (1973), 281

(58) Waxman, S.: Annotation. Folate Binding Proteins. Br J Haematol 29 (1975), 23

(59) Wetzels, E.: Hämodialyse und Peritonealdialyse. Berlin, Heidelberg, New York (1969)

(60) Whitehead, V. M., C. H. Comty, G. A. Posen, M. Kaye: Homeostasis Of Folic Acid In Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. New Engl J Med 279 (1968), 970

(61) Wu, A., I. Chanarin, G. Slavin, A. J. Levi: Folate Deficiency in the Alcoholic - its Relationsship to Clinical and Haematological Abnormalities, Liver Disease and Folate Stores. Br J Haematol 29 (1975), 469

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Schneider, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinik A, der Universität Düsseldorf, danke ich für die Möglichkeit, als Doktorand an seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Privatdozent Dr. med. J. Th. Fischer danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas. Durch sein Interesse und seinen Rat hat er meine Arbeit außerordentlich unterstützt.

Lebenslauf

Am 23. März 1951 wurde ich als Sohn des Landwirtes Hermann Peters und seiner Ehefrau Maria, geb. Ingenhütt, in Karken, Kreis Heinsberg, geboren.

Von April 1957 bis März 1965 besuchte ich die Katholische Volksschule in Karken. Danach absolvierte ich bis zum Sommer 1968 eine Lehre als Landwirtschaftsgehilfe, teils auf dem elterlichen Betrieb, teils in Lohmar (Siegkreis) und nahm während dieser Zeit am Unterricht der Berufsschulen in Heinsberg bzw. Siegburg teil. Im September 1968 ging ich zur landwirtschaftlichen Berufsaufbauschule in Willich (Krefeld), wo ich im Januar 1970 die fachgebundene mittlere Reife erlangte. Zu dieser Zeit änderten sich meine Interessen, ich hatte den Wunsch, Medizin zu studieren.

Ab September 1970 besuchte ich das staatliche Institut zur Erlangung der Hochschulreife in Oberhausen und bestand dort im Dezember 1972 die allgemeine Reifeprüfung.

Mit dem Studium der Medizin begann ich im April 1973 an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt. Nach Bestehen der ärztlichen Vorprüfung setzte ich mein Studium im April 1975 an der Universität Düsseldorf fort. Hier absolvierte ich im März 1976 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.